

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
6. September 2002 (06.09.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 02/068682 A2

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12Q 1/68,  
C12N 15/10, 15/39, C07K 14/07

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/01909

(22) Internationales Anmeldedatum:  
22. Februar 2002 (22.02.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
101 08 626.1 22. Februar 2001 (22.02.2001) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme  
von US): SAHIN, Ugur [TR/DE]; III Medizinische Klinik,  
Obere Zahlbacher Strasse 63, 55131 Mainz (DE).

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: TUERCI, Özlem [DE/DE]; III Medizinische  
Klinik, Obere Zahlbacher Strasse 63, 55131 Mainz (DE).  
LUDEWIG, Burkhard [DE/DE]; III Medizinische Klinik,  
Obere Zahlbacher Strasse 63, 55131 Mainz (DE).

(74) Anwälte: VOSSIUS, Volker usw.; Holbeinstrasse 5,  
81679 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,  
CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,  
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,  
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,  
MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,  
SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,  
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),  
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,  
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,  
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),  
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,  
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu  
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen  
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on  
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe  
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR IDENTIFYING BIOLOGICALLY ACTIVE STRUCTURES OF MICROBIAL PATHOGENS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR IDENTIFIZIERUNG BIOLOGISCH AKTIVER STRUKTUREN MIKROBIELLER ER-  
REGER

(57) Abstract: The invention relates to a method for identifying biologically active structures which are coded by the genome by  
microbial pathogens, starting from genomic controlled nucleic acids.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Identifizierung biologisch aktiver Strukturen, die  
durch das Genom von mikrobiellen Erregern kodiert werden, ausgehend von genomischen Erregernukleinsäuren.

WO 02/068682 A2

BEST AVAILABLE COPY

## **Verfahren zur Identifizierung biologisch aktiver Strukturen mikrobieller Erreger**

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Identifizierung biologisch aktiver Strukturen, die durch das Genom von mikrobiellen Erregern kodiert werden, ausgehend von genomischen Erregernukleinsäuren.

### **Hintergrund der Erfindung**

10

Die Entwicklung von molekular definierten Serodiagnostika und Impfstoffen setzt die molekulare Kenntnis und die Verfügbarkeit der durch das Immunsystem eines infizierten Wirtes erkannten Antigene des pathogenen Erregers (das mikrobielle Immunom) voraus. Die Serodiagnostik von Infektionskrankheiten basiert auf dem Nachweis von im Blut

15 zirkulierenden Antikörpern, die spezifisch gegen immunogene Bestandteile (Antigene) des Erregers gerichtet sind und somit eine vorhandene oder abgelaufene Infektion anzeigen. Die Kenntnis dieser Antigene erlaubt es, dieselben als molekular definierte Impfstoffe rekombinant herzustellen. Diese Impfstoffe können einem Organismus einen Schutz vor einer Infektion mit dem betreffenden Erreger bieten (prophylaktische Immunisierung) aber auch bei

20 persistierenden und chronischen Erregern zu deren Eliminierung dienen (therapeutische Immunisierung). Die Bedeutung, die solchen Antigenen sowohl für eine spezifische Diagnostik als auch für eine spezifische Therapie zukommt, führt zu einem beträchtlichen Interesse an der Identifikation dieser Strukturen.

Während für niedrigkomplexe Infektionserreger mit bekanntem Genom (z.B. einfache Viren)

25 die meisten relevanten Antigene molekular identifiziert sind, ist noch unklar, welche Antigene bei komplexeren Infektionserregern (z.B. Bakterien) immunologisch relevant sind. Die Ursache hierfür liegt darin, dass die komplexen Genome dieser Erreger eine Vielzahl von Genen (1000 bis über 4000) enthalten, die eine schnelle Identifikation der relevanten Antigene erschweren. Selbst bei Erregern, deren Genome vollständig bekannt sind, muss man

30 davon ausgehen, dass die Zuordnung aller Nukleotidbereiche zu tatsächlich für Proteine kodierenden -und somit potentiell Antigene ergebenden Abschnitten- noch nicht vollständig erfolgt ist.

Eine Reihe von Techniken, die zur Identifikation von Antigenen in den letzten Jahren entwickelt wurden, versuchen dieser Komplexität gerecht zu werden. Die meisten dieser

35 Verfahren stammen aus dem Feld der „Proteomics“-Technologien, welche Hochdurchsatz-Technologien der Proteinanalyse bezeichnet.

Eine dieser Hochdurchsatz-Technologien umfasst die Verwendung von 2-D-Gelen (z.B. Liu B, Marks JD. (2000), *Anal. Biochem.* 286,1191-28). Da bei diesem Verfahren große Mengen von Erregern benötigt werden, werden diese zunächst unter Kulturbedingungen angezüchtet. Danach werden Extrakte aus lysierten Erregern hergestellt und die darin befindlichen Proteine per Gelelektrophorese aufgetrennt. Durch Immunseren (Patientenseren, Seren immunisierter Tiere) erkannte Proteinkomplexe können durch Isolierung und Mikrosequenzierung analysiert werden. Dieses Verfahren weist eine Reihe von Limitationen und Nachteilen auf, da für die Untersuchungen große Mengen von Erregermaterial notwendig sind. Eine Analyse direkt aus der Primärläsion ist nicht möglich, sondern erst nach z.T. sehr langwieriger Kultur (z.B. bei Mykobakterien). Einige Erreger sind nicht einfach anzuzüchten, für unbekannte Erreger sind Kulturbedingungen oft nicht etabliert. Tote Erreger entziehen sich von vornherein diesem Anreicherungsverfahren.

Ein weiterer Nachteil der 2-D-Gel-Technologie besteht darin, dass sich der Genexpressionstatus eines Erregers in Zellkultur deutlich von dem *in vivo* unterscheidet. Viele pathogene Genprodukte werden erst bei der Invasion des Erregers in den Wirtsorganismus eingeschaltet. Damit stehen für die Untersuchung lediglich solche Proteine zur Verfügung, die im Infektionserreger zum Zeitpunkt der Kultur exprimiert werden. Damit wird eine Reihe von Proteinen, die nur im Wirt unter Infektionsbedingungen in detektierbarer Menge exprimiert werden, von der Untersuchung ausgeschlossen. Gerade solche können jedoch für eine diagnostische Serologie, die eine klinisch nicht relevante Kolonialisierung von einer invasiven Infektion unterscheiden können muss, relevant sein.

Weiterhin werden mittels 2-D-Gelen Antigene als Proteine identifiziert. Die Nukleotidsequenz, die Grundlage für viele nachfolgende Analysen ist, muss erst noch ermittelt werden.

Als Alternative zum 2-D-Gel-Verfahren können bei Erregern, deren gesamte Nukleotidsequenz bekannt ist, alle putativen Gene in Expressionskassetten eingeführt, rekombinant exprimiert und auf Immunogenität oder Antigenität untersucht werden (Pizza et al. (2000), *Science* 287(5459):1816-20). Die rekombinant exprimierten Gene werden z.B. in einem parallelisierten Dot-Blot Verfahren mit Immunseren gescreent.

Die Nachteile dieses Verfahrens bestehen darin, dass lediglich Proteine, von denen bekannt ist, dass sie im interessierenden Erreger exprimiert werden, der Analyse zugänglich sind. Erreger mit unbekannter Nukleotidsequenz entziehen sich dieser Analyse.

Da die oben genannten Untersuchungstechnologien material-, zeit-, personal- und kostenaufwendig sind, sind sie nur wenigen großen Zentren vorbehalten.

Eine effiziente und potentiell wirksame Alternative zu den „Proteomics“-Ansätzen stellt das Immunoscreening genomischer Expressionsbanken (z.B. Pereboeva et al. (2000), *J. Med. Virol.* 60: 144-151) dar. Allerdings müssen auch hierfür Infektionserreger unter definierten Kulturbedingungen angereichert werden. Das Genom der Erreger wird anschließend isoliert, enzymatisch oder mechanisch in Fragmente geschnitten und in Expressionsvektoren kloniert.

Die exprimierten Fragmente können dann mit Seren daraufhin überprüft werden, ob sie durch Seren von infizierten Organismen erkannt werden. Der Vorteil dieses Verfahrens ist, dass es kosteneffektiv und schnell zur Identifikation von Antigenen führen kann. Jedoch ist auch für dieses Verfahren aufgrund der großen Menge an benötigten Erregernukleinsäuren unumgänglich, dass die Erreger durch *in vitro* Kultur vermehrt und anschließend aufgereinigt werden. Damit ist das Verfahren bisher auf Erreger limitiert, für die Kultur- und Aufreinigungsmodalitäten bekannt und etabliert sind.

Ein Problem ist die Identifikation von bis dato nicht oder nur unzureichend charakterisierten Infektionserregern. Insbesondere [SH1] beschäftigt sich die vorliegende Erfindung mit den folgenden Aufgabenstellungen:

1) Entzündliche Erkrankungen mit aufgrund von Epidemiologie und klinischem Verlauf als wahrscheinlich anzunehmender infektiöser Ursache für die bisher mit bekannten Verfahren Erreger nicht definiert bzw. nur unzureichend charakterisiert werden können. Hierzu zählen Erkrankungen wie Multiple Sklerose, Kawasaki-Disease, Sarkoidose, Diabetes mellitus, Morbus Whipple, Pityriasis rosea u.a. Wünschenswert für diese Erkrankungen ist ein Verfahren, welches eine systematische Analyse auf bisher unbekannte Infektionserreger von primären Patientenmaterial z.B. Lymphknoten-Biopsien erlaubt.

2) Newly emerging infectious diseases. Hierzu zählen Infektionskrankheiten, die durch bisher nicht bekannte (z.B. HIV in den 80er Jahren) oder nicht gut charakterisierte Krankheitserreger verursacht werden und aufgrund z.B. Änderung der Epidemiologie plötzlich im Focus des klinischen Interesses stehen. Medizinisch und sozioökonomisch essentiell für diese Klasse von Infektionserkrankungen ist das schnell Erreger identifiziert und entsprechende Diagnostika und eventuell auch Impfstoffe produziert werden können. Da im allgemeinen die Etablierung der Kultivierungsbedingungen für nicht charakterisierte Erreger bis zu mehrere Jahre in Anspruch nehmen kann, ist auch in diesem Fall eine Identifikation von Erregern und Erregerantigenen direkt aus dem infizierten Gewebe sehr wünschenswert, kann aber durch bekannte Verfahren nicht geleistet werden.

Es besteht daher ein großer Bedarf an einem Verfahren, welches die direkte Verwendbarkeit von Primärmaterial zur Erregeridentifikation ohne Notwendigkeit einer Erregervermehrung durch Kultur erlaubt. Weiterhin sollte dieses Verfahren die effiziente Entdeckung bisher unbekannter Krankheitserreger in Primärmaterial ermöglichen.

**Zusammenfassende Beschreibung der Erfindung**

Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es daher ein Verfahren zu entwickeln, welches eine Identifikation von Erregernukleinsäuren direkt aus einer limitierten Menge (z.B. 50 mm<sup>3</sup>) infizierten Patientenmaterial ermöglicht.

- 5 Die vorliegende Erfindung beschreibt ein Verfahren zur systematischen Identifikation von bekannten wie auch unbekannten nukleinsäurekodierten Erregern und ihren Antigenen anhand der von ihnen ausgelösten Immunantwort im Wirtsorganismus.

- 10 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein Verfahren zur Identifizierung von biologisch aktiven Strukturen, die durch das Genom von mikrobiellen Erregern kodiert werden, ausgehend von genomischen Erregernukleinsäuren, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst: Gewinnung von genomischen Erregernukleinsäuren aus erregerhaltigen Proben, sequenzunabhängige Amplifikation von genomischen Erregernukleinsäuren, Expression amplifizierter Erregernukleinsäuren und Screening und Identifizierung der biologisch aktiven Struktur.

- 15 Das erfindungsgemäße Verfahren hat den entscheidenden Vorteil, dass auch bei sehr geringer Erregermenge eine umfassende Identifikation vom Wirtsorganismus erkannter Erregerantigene (mikrobielles Immunom) möglich ist.

- 20 Das erfindungsgemäße Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, dass geringste Ausgangsmengen bis minimal 1 pg Erregernukleinsäure ausreichen, um eine effektive Analyse zu erzielen. In einer bevorzugten Ausführungsform werden 10-20 pg, insbesondere 1-10 pg an Erregernukleinsäure verwendet.

- 25 Die hohe Sensitivität des Verfahrens ermöglicht einerseits die Untersuchung von Erregern aus Primärisolaten ohne die Notwendigkeit, diese Erreger zuvor durch *in vitro* Kultur anreichern zu müssen. Somit können Erreger untersucht werden, die sich mit bekannten Methoden schwer (z.B. Mykobakterium tuberculosis u.a.) oder gar nicht anzüchten lassen (z.B. Mykobakterium leprae oder nicht-vitale Keime).

Andererseits wird durch den Wegfall der *in vitro* Anreicherung vermieden, dass es zu einer durch die *in vitro* Kultur bedingten Verfälschung der Keimpopulation kommt (z.B. durch Überwachsen relevanter pathogener Keime bei Mischinfektionen).

- 30 Weiterhin eröffnet die hohe Sensitivität des Verfahrens die Möglichkeit, ein breites Spektrum an Ausgangsmaterialien zur Erregerisolierung zu nutzen. Der Begriff „Proben“ bezeichnet dabei verschiedene biologische Materialien wie Zellen, Gewebe, Körperflüssigkeiten. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung stellen Blut, Gewebe, kultivierte Zellen, Serum, Sekret aus Läsionen (Pusteln, Krusten etc.) und andere Körperflüssigkeiten wie z.B. Urin, 35 Speichel, Liquor, Gelenkflüssigkeiten, Galle und Augendrüsensekrete bevorzugt verwendete Proben dar.

**Detaillierte Beschreibung der Erfindung****Gewinnung von genomischen Erregernukleinsäuren aus erregerhaltigen Proben**

Im ersten Schritt des erfindungsgemäßen Verfahrens werden genomische  
5 Erregernukleinsäuren aus erregerhaltigen Proben gewonnen.

Der hier verwendete Begriff „mikrobieller Erreger“ umfasst virale und bakterielle Erreger. Erreger liegen in Wirtszellen oder im Zellverband mit Wirtszellen vor und müssen mit Ausnahme von frei im Serum zirkulierenden Erregern zugänglich gemacht werden. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung liegt der Erreger intrazellulär oder extrazellulär  
10 vor.

Intrazelluläre Erreger können durch Zellyse (z.B. mechanisch oder über Detergenzien, bei eukaryontischen Zellmembranen z.B. mittels SDS) freigesetzt werden. Bevorzugte SDS-Konzentration sind für gram positive Bakterien >0,05% bis 1% und für gramnegative Bakterien 0,05% bis 0,1%. Der Fachmann kann die geeignete Konzentration für andere  
15 Detergenzien leicht bestimmen, indem die Konzentration eingesetzt wird bei der die Hülle, z.B. die Bakterienwand des grampositiven oder des gramnegativen Bakteriums noch intakt ist, die eukaryontische Zellwand aber bereits aufgelöst wird.

Extrazelluläre Erreger können z.B. über ihre deutlich geringere Partikelgröße (20 nm-1 µM) von Wirtszellen getrennt werden (z.B. durch Sedimentation/Zentrifugation und/oder  
20 Filtration).

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist der Erreger nicht-infektiös und/oder nicht-vital. Die hohe Sensitivität des Verfahrens ermöglicht es, dass auch auf nicht-infektiöse und/oder nach Ablauf einer floriden Infektion auf residual verbliebene nicht-vitale Erreger zurückgegriffen werden kann.

25 Im folgenden wird der erste Schritt des erfindungsgemäßen Verfahrens, die Gewinnung genomischer Erregernukleinsäuren aus erregerhaltigen Proben weiter beschrieben.

Die Gewinnung genomischer Erregernukleinsäuren aus erregerhaltigen Proben ist in einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung durch die folgenden Schritte gekennzeichnet: Freisetzung von Erregerpartikeln aus erregerhaltigen Proben, nachfolgend Elimination und/oder Reduktion kontaminierender Wirtsnukleinsäuren und abschließend Extraktion der  
30 genomischen Erregernukleinsäure aus freigesetzten Erregerpartikeln.

Gemäss einer Ausführungsform der Erfindung erfolgt die Freisetzung von Erregerpartikeln durch Zellyse, Sedimentation, Zentrifugation und/oder Filtration.

Gemäss einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Elimination der kontaminierenden  
35 Wirtsnukleinsäuren dadurch, dass vor der Extraktion der Erregernukleinsäure ein RNase- und/oder DNase-Verdau durchgeführt wird.

Dies ist besonders dann vorteilhaft, wenn der Erreger ein durch Kapsidproteine geschütztes Virus ist. Da die Kapsidhülle von Viren einen Schutz vor Nukleasen bietet, sind die Erreger entsprechend vor der Aktivität extrazellulärer RNasen und DNasen geschützt.

- 5 Eine weitere Ausführungsform der Erfindung umfasst daher den Schritt der Elimination und/oder Reduktion kontaminierender Wirtsnukleinsäuren durch RNase und/oder DNase-Verdau besonders für virale Erreger (s. Beispiel Vacciniavirus). Die Dnase Behandlung zur Aufreinigung von Viruspartikeln ist dem Fachmann bekannt und kann durchgeführt werden wie beispielsweise beschrieben bei Dahl R, Kates JR., Virology 1970 ;42(2):453-62, Gutteridge WE, Cover B., Trans R Soc Trop Med Hyg 1973;67(2):254), Keel JA, Finnerty  
10 WR, Feeley JC., Ann Intern Med 1979 Apr;90(4):652-5 oder Rotten S. in Methods in Mycoplasmaology, Vol. 1, Academic Press, 1983.

- 15 Eine weitere Möglichkeit, Erreger wie grampositive oder gramnegative Bakterien aus Geweben anzureichern, ist wie im erfindungsgemäßen Verfahren angewandt, eine differenzielle Lyse (nachfolgend auch als sequentielle Lyse bezeichnet) infizierter Gewebe mit Detergenzien wie z.B. SDS, die Lipidmembranen auflösen. Hierbei macht man sich den Umstand zu Nutze, dass die Zellmembranen eukaryontischer Wirtszellen sehr viel empfindlicher auf niedrige Konzentration von SDS reagieren und aufgelöst werden, während Bakterienwände widerstandsfähiger sind und ihre korpuskuläre Integrität erhalten bleibt.

- 20 Nach Anreicherung werden die Erregernukleinsäuren von den korpuskulären Bestandteilen des Erregers abgetrennt und aus dem Erreger freigesetzt. Dies kann mittels dem Fachmann bekannten Standardtechniken durchgeführt werden, wobei in einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung die Abtrennung durch Proteinase K-Verdau, Denaturierung, Hitze- und/oder Ultraschallbehandlung, enzymatisch mit Lysozym-Behandlung oder  
25 organische Extraktion erfolgt.

- Die Aufreinigung von Bakterien/Viren durch Detergentien wie SDS kann durchgeführt werden wie bei Takumi K, Kinouchi T, Kawata T., Microbiol Immunol 1980;24(6):469-77, Kramer VC, Calabrese DM, Nickerson KW., Environ Microbiol 1980 40(5):973-6, Rudoi NM, Zelenskaia AB, Erkovskaia., Lab Delo 1975;(8):487-9 oder Keel JA, Finnerty WR,  
30 Feeley JC., Ann Intern Med 1979 Apr;90(4):652-5, s.a. US Patent 4,283,490.

Die Erfindung löst das Problem, dass in einem infizierten Gewebe / Organ nur ein Teil des Gewebes/Zellen mit dem Erreger infiziert ist.

- 35 Die vorliegende Erfindung ist auch geeignet zum Nachweis von Erregern bei Fällen wie z.B. Mykobakteriosen, wo nur wenige bis einzelne Erregerpartikel in den infizierten Geweben existent sind.

Die vorliegende Erfindung hat den Vorteil, das in den Fällen einer Infektion mit nur einer geringen Totalmenge an Erregernukleinsäuren pro Gewebseinheit (z.B. 50 mm<sup>3</sup>) der Nachweis der Erregers möglich ist. Als Zahlenbeispiel für DNA-kodierte Pathogene lässt sich errechnen das ca. 10<sup>6</sup> Viren mit einer durchschnittlichen Genomgröße von 10000 Basen bzw. 10<sup>4</sup> Bakterien mit einer durchschnittlichen Genomgröße von 1.000.000 Basen gerade 10 pg Erregernukleinsäuren beinhalten. Zudem ist das Genom von den meisten Infektionserregern deutlich kleiner als das menschliche Genom (bis Faktor 10<sup>6</sup> bei Viren, bis Faktor 10<sup>4</sup> bei Bakterien). Dadurch verdünnt sich der Anteil der Gesamtmenge Erregernukleinsäuren gegenüber der Gesamtmenge der Wirtsnukleinsäuren je nach Kopienzahl und Genomgröße des Erregers um eine vielfache Zehnerpotenz (Verhältnis Wirtsnukleinsäure / Erregernukleinsäure 10<sup>4</sup> bis 10<sup>9</sup>).

### Sequenzunabhängige Amplifikation von genomischen Erregernukleinsäuren

Das erfindungsgemäße Verfahren umfasst weiterhin die sequenzunabhängige Amplifikation genomischer Erregernukleinsäuren mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR), die der Vermehrung des Ausgangsmaterials dient.

Hierbei werden PCR-Primer mit Zufallssequenzen (Random-Oligonukleotide) verwendet, so dass nicht nur spezifische Genbereiche, sondern möglichst das gesamte Genom des Erregers repräsentativ amplifiziert werden kann (unselektive Nukleinsäureamplifikation mit degenerierten Oligonukleotiden). Diese Primer binden natürlich auch an Wirts-DNA. Diese wurden jedoch, wie oben beschrieben, durch vorhergehenden RNase- und/oder DNase-Verdau bzw. durch selektive Zelllyse reduziert bzw. eliminiert.

Allerdings ist Eliminierung bzw. Reduktion von Wirts-DNA durch vorhergehenden RNase- und/oder DNase-Verdau bzw. durch selektive Zelllyse nicht zwingend erforderlich in dem erfindungsgemässen Verfahren. Bei einer hohen Konzentration der Erreger- DNA oder RNA, wie sie zum Beispiel in Pusteln oder Virusbläschen ist eine Eliminierung bzw. Reduktion von Wirts-DNA nicht erforderlich.

Der hier verwendete Begriff „genomische Erregernukleinsäure“ umfasst sowohl genomische DNA als auch RNA.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist die genomische Erregernukleinsäure DNA, und ihre sequenzunabhängige Amplifikation erfolgt durch Klenowreaktion mit Adaptoroligonukleotiden mit degeneriertem 3'-Ende und nachfolgender PCR mit Oligonukleotiden, die der Adaptorsequenz entsprechen.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist die genomische Erregernukleinsäure RNA, und ihre Amplifikation erfolgt durch reverse Transkription mit degenerierten Oligonukleotiden und nachfolgender Amplifikation durch PCR.



Wenn nicht bekannt ist, ob der Erreger durch RNA oder DNA kodiert wird, werden beide Reaktionen in getrennten Reaktionsgefäßen angesetzt und getrennt amplifiziert. Die Amplikons repräsentieren in beiden Fällen genomische Nukleinsäurefragmente. Durch die Verwendung von degenerierten Oligonukleotiden wird eine zufällige Amplifikation (Shotgun-technik) des Gesamtgenoms ermöglicht.

Die Stärke des erfindungsgemäßen Verfahrens liegt in seiner hohen Sensitivität und Effizienz (Ausgangsmengen von wenigen picogramm reichen aus) bei gleichzeitig guter Erhaltung der Repräsentanz sämtlicher Bereiche des Gesamtgenoms. Die gute Repräsentanz der mikrobiellen Genabschnitte in den nach dem erfindungsgemäßen Verfahren generierten Bibliotheken wird durch Variationen in der Zwei-Schritt-PCR, wie z.B. Veränderungen der Salzkonzentration, erreicht. Die hohe Effizienz der Methode mit weitgehender Erhaltung der Repräsentanz erübrigt daher das Anlegen einer Primärkultur zur Vermehrung des Erregers mit allen durch sie bedingten Limitationen. Im Falle von unbekannten Erregern sind Kulturbedingungen nicht definiert und müssten im trial-and-error-Verfahren approximiert werden. Auch ist eine Reihe bekannter Erreger schwierig anzuzüchten. Bei Mischinfektionen können Primärkulturen durch Überwachungsphänomene gerade die relevante Erregerpopulation ausdünnen. Tote Erreger würden gar nicht erfasst. Diese Nachteile anderer Techniken werden durch das erfindungsgemäße Verfahren umgangen.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Sequenz-unspezifische Amplifikation von Erregernukleinsäuren in zwei sequentiell hintereinandergeschalteten PCR-Schritten von jeweils 35-40 Zyklen durchgeführt.

Hierzu wird nach der ersten Amplifikation 1/20 bis 1/50 des Volumens der ersten PCR für die Reamplifikation unter variierenden Bedingungen (z.B. Variation der MgCl Konzentration, der Pufferbedingungen, der Poylmerasen) genutzt. Durch die Reamplifikation in einer zweiten PCR wird wie im Beispiel 3A dargestellt, eine höhere Sensitivität des Verfahrens gewährleistet. Die Variation der Re-Amplifikationsbedingungen ermöglicht (siehe Beispiel 6, Abbildung 6) eine besonders gute Repräsentation unterschiedlicher Abschnitte des Erregergenoms und damit eine umfassende Analyse des Erregers.

### Expression amplifizierter Erregernukleinsäuren

Auf die Amplifikation der genomischen Erregernukleinsäuren folgt deren Expression. Dazu werden die Erregernukleinsäuren zur Erstellung einer genomischen Expressionsbank des Erregers in geeignete Expressionsvektoren kloniert.

In einer Ausführungsform der Erfindung sind die Expressionsvektoren ausgewählt aus der Gruppe der viralen, eukaryotischen oder prokaryotischen Vektoren. Im Rahmen der Erfindung können alle Systeme genutzt werden, die eine Expression von rekombinanten Proteinen erlauben.

- 5 Nach dem Einbringen der Erregernukleinsäuren in die Vektoren werden die Vektoren bevorzugt in Lambda-Phagen verpackt.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird die Expression der Erregernukleinsäuren durch Einbringen der Erregernukleinsäure in Lambda-Phagen Vektoren (z.B. Expressionsvektor Lambda-ZAP-Express, US Patent Nr. 5.128.256) gewährleistet.

- 10 Alternativ können auch andere Vektoren, die dem Fachmann bekannt sind, eingesetzt werden, besonders bevorzugt sind filamentöse Phagen-Vektoren, eukaryontische Vektoren, retrovirale Vektoren, adenovirale Vektoren oder Alphavirusvektoren.

#### 15 **Screening und Identifizierung der biologisch aktiven Struktur.**

Der abschließende Schritt des erfindungsgemäßen Verfahrens umfasst das Screening der genomischen Expressionsbank und die Identifizierung der biologisch aktiven Struktur des Erregers durch Immunantworten infizierter Wirte.

- 20 Der hier verwendete Begriff „biologisch aktive Struktur“ bezeichnet Erregerantigene, enzymatisch aktive Proteine oder Pathogenitätsfaktoren des mikrobiellen Erregers.

- Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung stellt das Screening ein Immunoscreening auf Erregerantigene dar und die Identifikation von Erregerantigenen umfasst die folgenden Schritte: Infektion von Bakterien mit Lambda-Phagen, Kultivierung der infizierten Bakterien unter Bildung von Phagenplaques, Transfer der Phagenplaques auf  
25 eine Nitrozellulosemembran (oder einer anderen Festphase, die zur Immobilisierung von rekombinanten aus den Erregern abgeleiteten Proteinen geeignet ist), Inkubation der Membran mit Serum oder antikörperhaltigen Körperflüssigkeiten des infizierten Wirtes, Waschen der Membran, Inkubation der Membran mit sekundärem alkalische Phosphatasegekoppeltem anti-IgG-Antikörper der spezifisch für Immunglobuline des infizierten Wirtes  
30 ist, Nachweis der mit Wirtsserum reaktiven Klone durch Farbreaktion, und die Isolierung und Sequenzierung der reaktiven Klone.

- Grundsätzlich ist es zur Identifikation der biologischen aktiven Struktur auch möglich, Erregernukleinsäuren in rekombinante filamentöse Phagen-Vektoren (z.B. pJufo)  
35 einzubringen, die eine Expression von Antigenen direkt auf den Oberflächen der filamentösen Phagen erlauben. In diesem Fall würde die Identifikation von Erregerantigenen die folgenden Schritte umfassen: Generierung von rekombinanten filamentösen Phagen durch Einbringen

der filamentösen Phagenvektoren in Bakterien, Inkubation generierter rekombinanter filamentöser Phagen mit Serum eines infizierten Wirtes, Selektion der filamentösen Phagen, an die Immunglobuline des Wirts gebunden haben, über immobilisierte Reagenzien die spezifisch für die Immunglobuline des infizierten Wirts sind, und Isolierung und Sequenzierung der selektierten Klone.

Vom Erregergenom abgeleitete und rekombinant exprimierte Proteine können z.B. auf Festphase gebunden oder im Rahmen eines Panning-/Captureverfahrens mit spezifischen Immunantwortäquivalenten des infizierten Wirtes gescreent werden. Dies sind zum einen Antikörper verschiedener Immunglobulinklassen/-subklassen, in erster Linie IgG. Zu diesem Zweck wird Wirtsserum verwendet. Dies sind aber auch spezifische T-Lymphozyten gegen MHC-restringiert erkannte Epitope von Erregerantigenen, die in einem eukaryotischen System getestet werden müssen.

Die Herstellungsbedingungen für die genomische Bank erfolgt so, dass die inserierten Fragmente aufgrund der Eigenart der PCR-Primer nach dem Zufallsgeneratorprinzip entstehen. Entsprechend sind Bereiche aus bekannten Antigenen repräsentiert, die natürlicherweise auch als Proteine gebildet würden. Auch Fragmente aus normalerweise nicht exprimierten intergenen Bereichen können entstehen, die je nach Länge offener Leseraster zur Expression kurzer Nonsensproteine oder -peptide führen können. Ein wichtiger Aspekt ist, dass im erfindungsgemäßen Verfahren automatisch auch bisher nicht identifizierte Erregerproteine vorliegen können.

#### Detalierte Beschreibung bevorzugter Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung

Die vorliegende Erfindung kombiniert die Expression der Gesamtdiversität aller erdenklichen rekombinanten Proteine mit der anschließenden Anwendung eines sehr stringenten Filters, nämlich die in infizierten Wirten im Rahmen des natürlichen Verlaufes der Erkrankung entstehende spezifische Immunantwort.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung werden die Erreger vor der Nukleinsäureamplifikation durch Fällung mit Polyethylenglykol, Ultrazentrifugation, Gradientenzentrifugation oder durch Affinitätschromatographie angereichert. Dieser Schritt ist jedoch nicht zwingend vorgesehen.

Die Fällung mit Polyethylenglykol ist vor allem bei viralen Partikeln effizient. Alternativ bietet sich bei bekannten Erregern die Affinitätschromatographie unter Nutzung von erregerspezifischen Antikörpern gegen definierte und stabile Oberflächenstrukturen an. Eine weitere Alternative ist bei unbekannten Erregern die Nutzung des polyklonalen Patientenserums selbst möglich, wobei das polyklonale Patientenserum auf der Festphase immobilisiert und zur Affinitätsanreicherung von Erregern als spezifisches Capture-Reagenz verwendet wird.

Das hier beschriebene Verfahren kann als Plattformtechnologie eingesetzt werden, um hocheffizient Antigen-kodierende Erregernukleinsäuren aus geringsten Mengen erregerhaltigen Materials zu identifizieren. Wie in den nachfolgenden Beispielen gezeigt, sind 1 bis 20 pg genomische Nukleinsäure ausreichend, um eine umfassende Identifikation des durch natürliche Immunantworten serologisch erkannten Antigenrepertoires einzelner Erreger zu leisten. So konnten mit der hier beschriebenen Technologie z.B. für das Vacciniavirus als immunodominant bekannte Antigene ausgehend von 20 pg DNA identifiziert werden.

Die geringe Menge an Nukleinsäuren, die für dieses Verfahren benötigt wird, ermöglicht die Anwendung des Verfahrens für medizinisch wichtige Fragestellungen, die mit den bisher bekannten Verfahren schlecht oder gar nicht bearbeitet werden konnten.

Hierzu zählt z.B. die systematische direkte Identifikation von Erregernukleinsäuren aus infizierten Zellen, z.B. empfängliche *in vitro* Zelllinien, Organe, entzündliche Läsionen wie z.B. Pusteln auf der Haut, auf Schleimhäuten, aus infizierten inneren lymphatischen und nicht-lymphatischen Organen oder aus erregerhaltigen Flüssigkeiten (z.B. Speichel, Sputum, Blut, Urin, Eiter, Ergüsse), die von infizierten Organismen gewonnen werden. Ausgehend von einer Sensitivität von 1 pg sind je nach Genomgröße des Erregers (z.B. Viren 3.000 - 250.000 bp oder Bakterien 100.000 - 5.000.000 bp) 50 bis  $10^5$  Erregerpartikel ausreichend, um für Antigene kodierende Erregernukleinsäuren zu identifizieren. Es ist zu erwarten, dass in den meisten Fällen die Anzahl von Erregerpartikeln weit über der Sensitivitätsgrenze des erfindungsgemäßen Verfahrens liegt.

Die hohe Sensitivität des erfindungsgemäßen Verfahrens erlaubt, wie bereits vorstehend beschrieben, eine Untersuchung von Erregern aus Primärisolaten ohne Notwendigkeit einer *in vitro* Kultur. Besonders wichtig ist, dass sehr kleine Mengen von Ausgangsmaterial, wie z.B. Stecknadelkopf-grosse Biopsien oder wenige Microliter infizierte Proben-Flüssigkeiten für die erfolgreiche Anreicherung und Identifikation von biologisch aktiven Strukturen durch das erfindungsgemäße Verfahren ausreichen. Hiermit kann das erfindungsgemäße Verfahren auf jegliches Überschussmaterial aus der medizinisch-klinischen Diagnostik und auf kryoarchivierte Probenmaterialien zugreifen (im Beispiel 9 dargestellt).

Die Sequenzierung der anhand des erfindungsgemäßen Verfahrens identifizierten Erregernukleinsäure führt zur Identifikation des Erregers, aus dem die Nukleinsäure ursprünglich stammt. Damit ist eine vorherige Kenntnis des Erregers nicht notwendig und das Verfahren eignet sich zur Entdeckung von bisher nicht definierten Infektionserregern bzw. zu bisher nicht bekannten Antigenen.

Das Verfahren kann somit zur Untersuchung einer Reihe von Erkrankungen eingesetzt werden, bei denen ein Infektionserreger ätiologisch vermutet wird, aber noch nicht identifiziert werden konnte. Hierzu zählen Erkrankungen, welche die Koch'schen Postulate teilweise erfüllen (z.B. Übertragbarkeit), bei denen jedoch die Keime aufgrund von fehlender Anzüchtbarkeit/Isolierbarkeit der Erreger nicht identifiziert werden können. Weitere Beispiele

sind Erkrankungen wie die Sarkoidose, Pitryiasis rosea, Multiple Sklerose, Diabetis Mellitus und Morbus Crohn.

Auch bei einem Teil von Patienten mit ätiologisch unklarer chronischer Hepatitis (chronische non-B, non-C Hepatitis) wird eine bisher unbekannte Viruserkrankung vermutet. Die Keimzahlen im Serum von Patienten mit bekannter chronischer Virushepatitis sind hoch. So finden sich bei Patienten mit infektiöser chronischer HBV- bzw. HCV-induzierter Hepatitis in 1 ml Blut  $10^7$ - $10^8$  Hepatitis B- bzw. Hepatitis C-Partikel. Unter der Annahme einer annähernd vergleichbaren Keimzahl ist das erfindungsgemäße Verfahren auch dazu geeignet, putative non-B, non-C Hepatitis-Erreger ausgehend aus geringen Mengen Blut/Serum (1-10 ml) infizierter Patienten zu identifizieren.

Der Schritt des Immunoscreening der vorliegenden Erfindung als hochsensitives und hochspezifisches Hochdurchsatz-Detektionsverfahren erlaubt die Identifikation einer Antigen-kodierenden Nukleinsäure unter  $10^6$ - $10^7$  nicht-immunogenen Klonen.

- 15 Hierzu reicht eine geringe Reinheit der Erregernukleinsäuren zur Identifizierung des Erregers aus. Diese geringe Reinheit kann problemlos durch verschiedene aus dem Stand der Technik bekannte Verfahren, wie z.B. Präzipitation von Erregerpartikeln mit Polyethylenglykol (PEG) und/oder Affinitätschromatographie und/oder Degradation von kontaminierenden Wirtsnukleinsäuren mit Nukleasen erreicht werden.
- 20 Eine zusätzliche Möglichkeit zur Anreicherung von Erregerpartikeln ist die Nutzung der in infizierten Organismen gegen Erregerpartikel gebildeten spezifischen Antikörper für Capture-Verfahren.

- Das Immunoscreening als integraler Bestandteil des Verfahrens erlaubt die Analyse von  $10^6$ - $5 \times 10^6$  Klonen innerhalb von kurzer Zeit (2 Monaten) durch eine einzige Person. Die Kombination aus sequenzunabhängiger Amplifikation und serologischer Untersuchung mit hohem Durchsatz aller Nukleinsäureabschnitte in allen 6 Leserastern erlaubt schon bei mäßiger Reinheit der Ausgangsnukleinsäuren (Erregernukleinsäuren  $> 1\%$  der Gesamtnukleinsäuren) die umfassende Untersuchung aller potentiell für Polypeptide kodierenden Regionen unabhängig vom aktuellen Expressionstatus. Durch die Untersuchung von genomischen Nukleinsäuren werden alle Genregionen erfasst, auch Gene, die nur zu bestimmten Zeitpunkten (z.B. nur in bestimmten Infektionszeitphasen) eingeschaltet werden. Dies erlaubt nicht nur eine Aussage über einzelne Antigene, sondern gibt auch Informationen über die Gesamtheit der Nukleotid-kodierten immunogenen Regionen (Immunom, siehe Abbildung 4A-C und 5). Über die Identifikation multipler z.T. überlappender Fragmente wird darüberhinaus eine Einengung des serologisch erkannten Epitops innerhalb eines identifizierten Antigens ermöglicht (siehe Abbildung 4A-C). Die Stärke des Signals ermöglicht eine weitere Diskriminierung von dominanten und nichtdominanten Epitopen (siehe Abbildung 4A-C). Die identifizierten Erreger-Nukleinsäurefragmente sind direkt für die Entwicklung von Serodagnostika und Impfstoffen verfügbar. Die identifizierte

Nukleinsäure kann als Matrize für die Entwicklung hochsensitiver direkter Erregernachweismethoden z.B. durch Anwendung von Nukleinsäure-spezifischer Amplifikation über die Polymerasekettenreaktion (PCR) genutzt werden. Die identifizierten Fragmente können auch für die Entwicklung von Diagnosetests basierend auf dem Nachweis von Antigen-spezifischen T-Lymphozytenreaktionen genutzt werden.

Die Abgrenzung gegen Technologien wie „Proteomics“ ist schon in der Einleitung diskutiert worden. Das erfindungsgemäße Verfahren unterscheidet sich technisch gegenüber zwei weiteren verwandten Methoden: die serologische Untersuchung von genomischen Erregerbibliotheken und der SEREX-Technologie.

- 10 Für die serologische Untersuchung von genomischen Bibliotheken wurden von einigen Gruppen (z.B. Luchini et al. (1983), *Curr Genet* 10:245-52, Bannantine et al. (1998), *Molecular Microbiology* 28: 1017-1026) Expressionsbibliotheken aus aufgereinigter mechanisch zerkleinerter oder enzymatisch verdauter Erreger-DNA hergestellt. Für die Herstellung von Expressionsbibliotheken mit diesem Verfahren werden zur Herstellung repräsentativer Banken je nach Größe des Genoms zwischen 0,5 – 5 µg an aufgereinigten Erregernukleinsäuren benötigt (Faktor  $10^5$ - $10^6$  Mehrbedarf an Erregernukleinsäuren). Hiermit verschließt sich die Methode der Untersuchung von Erregern aus Primärisolaten, in denen weitaus geringere Mengen an Erregern und Erregernukleinsäuren vorhanden sind. Es ist hier unumgänglich, dass die Erreger isoliert, *in vitro* angezüchtet und anschließend aufwendig aufgereinigt werden. Damit müssen als Grundvoraussetzungen zur Anwendung dieser Methode die Kultur- und Aufreinigungsmodalitäten für den jeweiligen Erreger bekannt und zuvor etabliert sein. Dies ist jedoch gerade für viele Viren und intrazelluläre Erreger technisch aufwendig und verlangt eine große Expertise. Damit entfällt auch die Möglichkeit, unbekannte Erreger, sowie solche, die nicht mehr vital sind, zu identifizieren.
- 25 Eine weitere Abgrenzung ist gegenüber der mit SEREX (Sahin et al. (1995), *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 11810-3; Sahin et al. (1997), *Curr Opin Immunol* 9, 709-716) bezeichneten Methode vorzunehmen. Für SEREX wird aus erkrankten Geweben mRNA extrahiert, cDNA-Expressionsbibliotheken hergestellt und mit Seren desselben Individuums, aus dem das Gewebe stammt, auf immunreaktive Antigene gescreent.
- 30 Ein wesentlicher Unterschied zum erfindungsgemäßen Verfahren besteht darin, dass für die SEREX-Methode cDNA-Expressionsbibliotheken aus Wirtszellen infizierter Gewebe verwendet werden.

Die unterschiedliche Qualität und der unterschiedliche Ursprung der Nukleinsäuren führt zu folgenden Unterschieden:

- 35 Die Verwendung von Gesamt-mRNA aus Wirtszellen erhöht bei SEREX die Komplexität der Bibliothek und vermindert die Wahrscheinlichkeit der Identifikation Erreger-abgeleiteter Transkripte. Für tierische Wirtszellen ist von 40.000 bis 100.000 unterschiedlichen wirtseigenen Transkripten auszugehen. Die Anzahl der Transkripte für die meisten Erreger liegt weitaus geringer (Viren 3-200 Transkripte, Bakterien 500-4000 potentielle

Genprodukte). Zusätzlich ist in den meisten Fällen nur ein geringer Teil von Wirtszellen mit Erregern infiziert, so dass der Anteil Erreger-abgeleiteter Nukleinsäuren in der GesamtmRNA Population sich weiter verdünnt. Da viele wirtseigene Transkripte auch für natürliche oder krankheitsassoziierte Autoantigene kodieren (Sahin et al., 2000, Scanlan et al. (1998), *Int J Cancer* 76, 652-658) ist die Identifikation von Erreger-abgeleiteten Antigenen durch die präferentielle Detektion von Wirts-Gewebsautoantigenen sehr erschwert. Dieser Umstand ist verantwortlich dafür, dass mit der SEREX-Technologie bei der Untersuchung von mehreren infizierten Geweben, wie z.B. von HBV-Ag+ Leberzell-Karzinomen (Scanlan et al. (1998), *Int J Cancer* 76, 652-658; Stenner et al. (2000), *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9, 285-90) bisher noch keine Erregerantigene identifiziert worden sind.

Aus den nachfolgenden Abbildungen und Beispielen wird ersichtlich, dass mit dem Verfahren der vorliegenden Erfindung aus geringsten Mengen von Erregernukleinsäuren immunologisch relevante virale und bakterielle Antigene identifiziert und charakterisiert werden können. Die in den nachfolgenden Beispielen identifizierten viralen Antigene waren dabei über das gesamte Genom des Vacciniavirus verteilt, was auf eine gute Repräsentanz der verschiedenen Gene in der mit Hilfe des erfindungsgemässen Verfahrens amplifizierten DNA schließen lässt (siehe Abb. 5). Eines der in den Beispielen identifizierten Antigene evokiert sogar neutralisierende Antikörper und ist somit im therapeutischen Zusammenhang von großer Wichtigkeit. Somit ist das Verfahren auch für die Auffindung von für die Therapie wichtiger Antigene geeignet.

Das erfindungsgemässe Verfahren wurde in den vorliegenden Beispielen für die Identifikation von viralen und bakteriellen Antigenen eingesetzt. Erfindungsgemäß werden für bakterielle Erreger vorzugsweise die folgenden SDS-Konzentration zur Anreicherung von gramnegativen bzw. grampositiven Erregern eingesetzt (siehe Abb. 8): Für Gram-positive Bakterien >0,05% bis 1% und für Gram-negative Bakterien 0,05% bis 0,1% SDS.

Wenn keine Anhaltspunkte vorliegen, ob ein Erreger ein Virus oder ein Bakterium ist, kann aufgrund der sehr geringen benötigten Materialmenge die Ausgangsprobe aufgeteilt werden (z.B. auf zwei Probengefäße) und unter der Annahme eines ursächlichen viralen bzw. bakteriellen Erregers methodisch unterschiedlich verarbeitet werden (Abb. 12).

In einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung neue Vaccinavirusantigene, dadurch gekennzeichnet, dass das Antigen von einer Nukleinsäure kodiert wird, die 80% Homologie, insbesondere 90% Homologie und vorzugsweise 95% Homologie zu einer der Sequenzen SEQ ID NOS: 4,5,6,7,8,9,10, 11,12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 oder 22 aufweist.

Besonders bevorzugt sind Vaccinavirusantigene, die dadurch gekennzeichnet sind, dass das Antigen von einer der Nukleinsäuren SEQ ID NOS: 4,5,6,7,8,9,10, 11,12, 13, 14, 15, 16, 17, 18,19, 20, 21 oder 22 codiert wird.

Die erfindungsgemäßen Vaccinaantigene die durch das erfindungsgemäße Verfahren identifiziert wurden sind im Beispiel 5 und Tabelle 3 näher beschrieben. Bevorzugte Nukleinsäuresequenzen, die die Vaccinavirusantigene codieren sind im Sequenzprotokoll als SEQ ID NOS: : 4,5,6,7,8,9,10, 11,12, 13, 14, 15, 16 ,17, 18,19, 20, 21 oder 22 dargestellt. Die bevorzugten Nukleinsäuresequenzen sind zusätzlich in Abbildung 13 dargestellt..

In weiterer Aspekt der Erfindung betrifft daher auch die Verwendung der Nukleinsäuren SEQ ID NOS: 4-22 und Nukleinsäuren, die mit diesen 80, 90 oder 95% Homologie aufweisen in Nachweisverfahren des Vaccinavirus. Derartige Nachweisverfahren sind dem Fachmann bekannt.

10 Weitere Verwendungen für die erfindungsgemäßen Vacciniavirusantigene:

- Möglicher serologischer Nachweis von Variola major (Erreger der Pocken) über konservierte Epitope in Vacciniavirusantigenen. Variola major ist einer immunologischen Analyse nicht zugänglich, da in Militärlaboren verschlossen.
- Impfung gegen Variola major mit Subunitvakzinen. Die Impfung mit dem Vacciniavirus erzeugt einen guten Schutz gegen den Pockenerreger. Einzelne Vacciniavirusantigene sind daher potenzielle Kandidaten für die Induktion von immunologischem Schutz gegen den Pockenerreger.

20

Die folgenden Abbildungen dienen der Erläuterung der Erfindung:

**Abb.1.** Schematische Darstellung der aufeinanderfolgenden Analyseschritte einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens.

**Abb 2A Amplifikation unterschiedlicher Ausgangsmengen von Erregernukleinsäuren.**

25 Klenow-getaggte Vacciniavirus-DNA wurde wie im Beispiel 3A erläutert einmalig für 35 Zyklen amplifiziert (PCR1) bzw. 1 µl für weitere 35 Zyklen reamplifiziert (Re-PCR1). Als Ausgangsmengen für die Amplifikation dienten 1 ng (Spur 1), 40 pg (Spur 2), 8pg (Spur 3), 0,8pg (Spur 4), bzw 0,08pg (Spur 5) Klenow-Enzym getaggte Vacciniavirus-DNA. Spur 6 stellt die Negativkontrolle ohne Zugabe von Vacciniavirus-DNA dar.

30 **Abb. 2B.** Amplifikation von Vacciniavirus-DNA; die Amplifikation der Vacciniavirus-DNA wurde durch eine Klenow-Enzym-Reaktion eingeleitet (links), für die Adaptoroligonukleotide mit degeneriertem 3'-Ende für ein sequenzunabhängiges Priming verwendet wurden. Darauf folgt die eigentliche PCR-Amplifikation mit Oligonukleotiden, die der Adaptorsequenz entsprechen. Die beschriebenen PCR-Bedingungen führten zu Fragmenten unterschiedlicher  
35 Länge (200-2500 bp) (rechts).



**Abb. 3.** Abb. 3 zeigt das Immunoscreening und die Identifizierung des 39kDa Antigen Klon 3 (288-939) und des ATI Antigen Klon 1 (511-111). Anfänglich im Screening identifizierte Klone wurden zunächst oligoklonal unter Zunahme von benachbarten nicht-reaktiven Phagenplaques isoliert und nach Bestätigung monoklonalisiert.

- 5 **Abb. 4A.** Abb. 4A zeigt Klon 1 (288-688), Klon 2 (288-788) und Klon 3 (288-938), die für überlappende Bereiche aus dem 39kDa-Protein von Vacciniavirus kodieren. Die Klone sind unterschiedlich immunreaktiv.

**Abb. 4B.** Abb. 4B zeigt drei Klone, die für überlappende Bereiche des A-type inclusion protein (ATI) von Vacciniavirus kodieren und gleiche Immunreaktivität aufweisen.

- 10 **Abb. 4C.** Abb. 4C zeigt drei Klone, die für überlappende Bereiche des plaque size /host range protein (ps/hr) von Vacciniavirus kodieren und unterschiedlich immunreaktiv sind.

- Abb. 5.** Abb. 5 zeigt die Verteilung der mit dem erfindungsgemäßen Verfahren identifizierten Klone im Vacciniavirusgenom. Die identifizierten Antigene sind über das ganze  
15 Vacciniagenom verteilt, was auf eine gute Repräsentanz der Vacciniavirusgene in der über das erfindungsgemäße Verfahren hergestellten Bibliothek schließen lässt.

- Abb. 6.** Abb. 6 zeigt die molekulare Analyse der Repräsentanz von zehn arbiträr ausgesuchten Vacciniavirusgenen in der durch das erfindungsgemäße Verfahren  
20 amplifizierten Vacciniavirus DNA. Zehn Genabschnitte aus dem Genom des Vacciniavirus wurden per PCR synthetisiert. Je 10 ng der 317 bis 549 bp langen Genabschnitte wurden durch Gelelektrophorese in Agarosegelen aufgetrennt, über das Southern Blotting-Verfahren auf eine Nylonmembran überführt. Für die Herstellung der <sup>32</sup>P-markierten Sonde wurden in  
25 10-20 pg Vacciniavirus-DNA eingesetzt. Abb. 6A zeigt die Hybridisierung mit PCR-Fragmenten aus einer einzigen Re-PCR. Abb. 6B zeigt die Verbesserung der Repräsentanz indem gepoolte Fragmente aus mehreren wie im Beispiel 2 beschriebenen variierten Re-PCRs für die Hybridisierung eingesetzt wurden. Die Hybridisierung der gepoolten amplifizierten DNA mit den geblotteten zehn zufällig ausgewählten Abschnitten (sichtbar als schwache bis deutliche Schwärzung) des Vacciniavirusgenoms zeigt, dass alle Abschnitte in der  
30 amplifizierten DNA enthalten sind. Herauszustellen ist, dass selbst das Gen mit dem schwächsten Hybridisierungssignal (Spur 2, 94kDa A-Type inclusion protein, ATI) im Immunoscreening der Bibliothek 30-mal als Antigen identifiziert wurde (s. Tabelle 3).

- Abb. 7A.** Abb. 7A zeigt die Bestimmung des Serumtiters gegen das durch das  
35 erfindungsgemäße Verfahren klonierte immundominante 39 kDa Antigen des Vacciniavirus. Serum von C57BL/6 Mäusen wurde am Tag 21 nach Infektion mit dem Vacciniavirus gewonnen und wie angegeben verdünnt. Zur Produktion des Antigens wurden E. coli

Bakterien mit einem das 39 kDa Antigen kodierenden Lambaphagen infiziert. Die Reaktivität der Serumverdünnungen gegen das so rekombinant exprimierte 39 kDa Antigen wurde auf Nitrocellulosemembranen getestet. Für das hier verwendete Serum ist der Antikörpertiter >1:16000.

- 5 **Abb. 7B.** In Abbildung 7B ist der Verlauf des Antikörpertiters gegen das 39 kDa Antigen nach Infektion mit  $2 \times 10^6$  pfu Vacciniavirus oder mit  $2 \times 10^5$  pfu des Lymphocytären Choriomeningitisvirus (Stamm WE) dargestellt. Nicht infizierte Tiere (naiv) zeigen keine Reaktivität gegen das 39 kDa Antigen. Die hohe Spezifität der Reaktion ist auch durch die nur minimale Kreuzreaktivität mit dem Serum aus mit dem Lymphocytären
- 10 Choriomeningitisvirus infizierten Mäusen (Tag 14) gezeigt.

- Abb. 8.** Abb. 8 zeigt die unterschiedliche Empfindlichkeit von eukaryontischen Zellen und gramnegativen bzw. grampositiven Bakterien. Für das Experiment wurden vergleichbare Zellvolumina von gramnegativen Bakterien (oben), grampositiven Bakterien (Mitte) bzw.
- 15 eukaryontischen Zellen mit den angegebenen Konzentrationen von SDS inkubiert. Nicht lysierte korpuskuläre Strukturen wurden durch Zentrifugation pelletiert. Während eukaryontische Zellen bereits bei geringsten Konzentrationen vollständig von SDS lysiert werden (kein sichtbares Zellpellet, mikroskopisch keine sichtbaren Zellen) sind Bakterien widerstandsfähiger und können, da ihre korpuskuläre Integrität erhalten blieb, durch
- 20 Zentrifugation angereichert werden.

- Abb. 9.** Abb. 9 zeigt die Identifikation und molukulare Charakterisierung von putativen Antigenen des humanpathogenen Bakteriums *Tropheryma whippelii*. Interleukin-10 und Interleukin-4 deaktivierte humane Makrophagen wurde mit *T. whippelii* Bakterien enthaltendem Gehirnmateriale eines an der Whippleschen Erkrankungen verstorbenen
- 25 Patienten inkubiert. Bakterienspezifische Gene wurden durch differenzielle Lyse und anschliessende DNA-Aufarbeitung isoliert und Bibliotheken nach dem erfindungsgemässen Verfahren konstruiert. Das Immunoscreening wurde mit Seren von *T. whippelii* infizierten Patienten durchgeführt. Die bioinformatische Analyse, d.h. der Abgleich mit öffentlich zugänglichen Sequenzdatenbanken, zeigt, dass bisher nicht bekannt bakterielle Antigene
- 30 durch das erfindungsgemässe Verfahren identifiziert wurden.

- Abbildung 10:** Isolation von Bakterien direkt aus dem Milz-Gewebe eines Patienten mit Whipple-Disease. Bakterien wurde aus einer kryopräservierten Milzprobe eines Patienten mit Whipple-Disease wie im Beispiel 9 dargestellt isoliert und fluoreszenzmikroskopisch
- 35 analysiert. Das Bild zeigt die Überlagerung die Aufnahme im Phasenkontrast (Nachweis korpuskulärer Partikel, oben) und nach Überlagerung mit blauen Fluoreszenzsignal (Nachweis DNA).

**Abbildung 11A:** Anreicherung von Erregernukleinsäuren direkt aus einer Patientenprobe wie in Beispiel 9 beschrieben.

**Abbildung 11B:** Amplifikation von direkt aus Patientenproben isolierten Erregernukleinsäuren. Die aus der Milzprobe angereicherte Bakterien-DNA wurde wie im  
5 Beispiel 10 beschrieben amplifiziert (Spur 2). Spur 1 stellt die Positivkontrolle mit einer anderen DNA-Probe dar. Auf Spur 3 ist die Negativkontrolle ohne Zusatz von DNA aufgetragen.

**Abbildung 12:** Schema eines möglichen Vorgehens für die Identifikation von Erregerantigenen für den Fall, dass nicht bekannt ist, ob der Erreger ein Virus oder ein  
10 Bakterium darstellt. Die Ausgangsprobe wird aufgeteilt und mittels unterschiedlicher, die Identifikation von bakteriellen bzw. viralen Erregern ermöglichenden Verfahren verarbeitet.

**Abbildung 13:** Abbildung 13 zeigt die Nukleinsäuresequenzen der in Tabelle 3 aufgelisteten identifizierten Vacciniavirusantigene. Die Nukleinsäuresequenzen entsprechen den Sequenzen SEQ ID NO: 4 bis SEQ ID NO: 22 im Sequenzprotokoll.

15

Die vorliegende Erfindung wird weiterhin durch die folgenden Beispiele in nicht-limitierender Weise veranschaulicht.

## Beispiele

### 20 Beispiel 1

#### Isolierung von Erregernukleinsäuren aus Virus-infizierten Zellen:

BSC40 Zellen wurden mit  $2 \times 10^6$  pfu Vacciniaviren infiziert. Infizierte Zellen wurden bei 37°C im CO<sub>2</sub>-Inkubator 24 h inkubiert und geerntet. Geerntete Zellen wurden anschließend homogenisiert und in gepuffertem Medium aufgenommen. Zur Trennung von Viruspartikeln  
25 von Wirtszellfragmenten wurde das in Medium aufgenommene Zellysatz anschließend mit Ultraschall behandelt. Grobpartikuläre Strukturen wurden durch Zentrifugation 15min x 3000 U/min pelletiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und das Pellet verworfen. Um korpuskuläre Partikel im Überstand zu präzipitieren, wurde 2 ml gekühlter Überstand mit 6% PEG6000/0,6M NaCl präzipitiert (1h Inkubation auf Eis) und nachfolgend  
30 das Präzipitat mittels Zentrifugation bei 10000 x g für 10 min pelletiert. Da die vorhergehenden Schritte sowohl eine Abtrennung als auch eine Lyse kontaminierender Wirtszellen erbracht haben sollten, wurde jetzt nach Verwerfen des Überstandes das Präzipitat in 300 µl DNase/RNase Puffer aufgenommen und 30 min bei 37°C mit RNase und DNase  
35 verdaut. Hierdurch wurden die nun extrazellulär vorliegenden Nukleinsäuren der vorher desintegrierten Wirtszellen eliminiert. Die Virusnukleinsäuren werden durch die intakte Viruskapsid vor den Nukleasen geschützt und nicht degradiert. Viruspartikel wurden durch

vortexen mit 1 Volumen GITC-Puffer aufgeschlossen, was auch zur Inaktivierung der zugegebenen Nukleasen führt. Freigesetzte Erreger-DNA wurde mit Phenol/Chloroform extrahiert und mit 1 Isovolumen Isopropanol gefällt. Die gefällten Nukleinsäuren wurden mit 80% Ethanolol gewaschen und in 20 µl H<sub>2</sub>O dest. aufgenommen.

5

## **Beispiel 2**

### **Infektion mit Vacciniavirus und Serumgewinnung**

Rekombinantes Vacciniavirus mit dem Glykoprotein des Vesikulären Stomatitis Virus (VaccG) (Mackett et al.(1985), *Science* 227, 433-435.) wurde auf BSC40 Zellen gezüchtet und die Viruskonzentration im Plaque-Assay bestimmt. C57BL/6 Mäuse (Institut für Labortierkunde, Universität Zürich) wurden i.v. mit  $2 \times 10^6$  pfu VaccG infiziert. Den Mäusen wurden 200-300 µl Blut an den Tagen 8, 16 und 30 nach Infektion entnommen und Serum wurde durch Zentrifugation gewonnen und bei -20°C gelagert.

Nach erfolgter Immunisierung der Mäuse wurde die erfolgreiche Induktion von anti-Vacciniaantikörpern im Neutralisationsassay gegen VSV getestet (Ludewig et al.. 2000. Eur J Immunol. 30:185-196), um den besten Zeitpunkt der Serumabnahme für die geplanten Analysen zu ermitteln. Wie in Tabelle 1 dargestellt, hat ab Tag 16 der Anstieg sowohl des Gesamt-Immunglobulin, als auch der IgG-Klasse ihr Maximum erreicht, so dass dieses Serum der Abnahmetage 16 und 30 verwendet werden konnte.

20

**Tabelle 1: Titerverlauf von Antikörpern nach Immunisierung mit Vacciniavirus**

Tag post inoculationem	Gesamt-Immunglobulin (in 40xlog2)	IgG (in 40xlog2)
8	9	6
16	12	11
30	12	12

### **Beispiel 3A Globale Amplifikation geringster Mengen an Erreger-Nukleinsäuren**

Die globale Amplifikation von genomischen Nukleinsäuren des Erregers ist ein essentieller Schritt in dem erfindungsgemässen Verfahren. Hierbei ist die Hauptherausforderung die sehr geringe Menge genomischer Keimnukleinsäuren, die (ohne Vorkultur) aus infizierten Geweben isoliert werden, umfassend (d.h. möglichs alle Abschnitte des Genoms

miteinschliessend) zu amplifizieren. Zudem muss die amplifizierte DNA für das nachfolgende Screening exprimierbar und klonierbar sein. Während PCR-amplifizierte cDNA-Expressionsbibliotheken vielfach beschrieben, hergestellt und benutzt werden (z.B. Edwards et al., 1991) und z.T. als Kitlösung angeboten werden (z.B. SMART-cDNA library construction kit, Clontech), ist die Herstellung umfassender genomischer Bibliotheken ausgehend von geringen Mengen (<10 ng) von Erregernukleinsäuren bisher nicht beschrieben. Daher war es notwendig für das erfindungsgemässe Verfahren ein DNA-Amplifikationsmodul zu entwickeln, welche die Herstellung von umfassenden genomischen Expressionsbanken aus Subnanogrammengen Material erlaubt. Die Methode wurde für das Vacciniavirusgenom etabliert und ist ohne Modifikationen für alle DNA-kodierten Erreger und mit geringen Modifikationen auf RNA kodierte Pathogene übertragbar. Die Amplifikation der Vacciniavirus-DNA wurde durch eine Klenow-Enzym Reaktion eingeleitet, für die Adaptor-Oligonukleotide mit degeneriertem 3'-Ende für ein sequenzunabhängiges Priming nach dem Random-Prinzip verwendet wurden. Hierauf folgen sequentiell zwei PCR-Amplifikationen mit Oligonukleotiden, die der Adaptorsequenz entsprechen. In einer Reihe von unabhängig durchgeführten Experimenten sind die Bedingungen für eine besonders effiziente Amplifikation erarbeitet worden. Nach Optimierung der Methode wurden zur Bestimmung der Sensitivität verschiedene Mengen Vaccinia-Virus DNA (u.a. 25 ng, 1 ng, 200 pg, 20 pg, 2 pg) mit 2 pMol Adaptor-N(6) (GATGTAATACGAA[P2][P3]TTGGACTCATATANNNNNN) gemischt, 5 min bei 95°C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. N steht hierbei für den degenerierten Primeranteil. Nach Vorbereitung eines Reaktionsansatzes mit Klenow-Enzym (2 U), DNA-Polymerase-1 Puffer (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 7,5 mM Dithiothreitol, 1 nMol dNTPs) wurde eine Primerverlängerung bei 37°C für 2 h durchgeführt. Anschließend erfolgte die Reinigung der durch Klenow-Polymerase elongierten Fragmente von den freien Adaptoroligonukleotiden über Standardtechniken. Jeweils 1/25 (d.h. 1 ng, 40 pg, 8 pg, 0,8 pg, 0,08pg) der mit Klenow-Polymerase getaggtten DNA wurden für einen ersten Amplifikationsschritt eingesetzt. Die PCR-Amplifikation mit Adaptor-Oligonukleotiden wurde mit zwei unterschiedlichen Oligonukleotiden (EcoR1-Adaptoroligonukleotid GATGTAATACGAATTCGACTCATAT bzw. MfeI-Adaptor-Oligonukleotid GATGTAATACAATTGGACTCATAT) (Anlagerung bei 60°C 1 min; Verlängerung bei 72°C 2,5 min; Denaturierung 94°C 1min; 35 Zyklen) durchgeführt. Die einmalige Amplifikation der Nukleinsäuren bei Nukleinsäuren von weniger als 40 pg erwies sich als nicht ausreichend um eine optisch im Ethidiumbromid/Agarosegel detektierbaren Amplifikationsschmier zu erzeugen. Je 1 µl des Amplifikats wurden daher anschließend als Template in eine zweite Amplifikation unter identischen Bedingungen für 30-35 Zyklen überführt. Die amplifizierten Produkte wurden gelelektrophoretisch analysiert. Die beschriebenen PCR-Bedingungen führten zu einer Amplifikation mit Fragmenten unterschiedlicher Länge (150-2000 bp) in allen Versuchsanordnungen bis minimal 0,8 pg Template DNA (Abb. 2A). Dabei wurden bei niedrigeren Ausgangsmengen von DNA im Durchschnitt kürzere Fragmente amplifiziert. In verschiedenen Experimenten wurden die Bedingungen für die Re-PCR variiert. Hierbei erwies sich das eine Variation der

Pufferbedingungen (z.B. Mg-Konzentration) und Variation der eingesetzten Enzyme z.B. Stoffel-Fragment der Taq-Polymerase unterschiedliche Amplifikationsmuster erzeugten (s. Abbildung 6). Für die Reamplifikation werden lediglich 1/50 der initialen PCR verwendet. Somit kann die Re-Amplifikation unter 50 verschiedenen Bedingungen durchgeführt werden.

5 Das eine Variation der Amplifikationsbedingungen eine besonders gute umfassende globale Amplifikation erlauben, wurde in der Repräsentanz-Analyse im reversen Southern-Blot nachgewiesen (s. Abb. 6). Zur Überprüfung der Identität amplifizierter Fragmente wurden diese über Standardverfahren in den Bluescript Klonierungsvektor (Stratagene) ligiert und 20 Klone wurden sequenziert. 20 von 20 Sequenzen stimmten mit Vacciniavirus-Sequenzen

10 überein, sodass eine Amplifikation von Artefakt-Sequenzen (z.B. polymerisierte Primersequenzen) ausgeschlossen werden konnte.

### **Beispiel 3B: Herstellung einer genomischen Bibliothek**

Die Herstellung einer Vaccinia-Bibliothek erfolgte durch Amplifikation von 20 pg einer mit

15 Klenow-Polymerase getaggtten Vaccinia DNA analog den im Beispiel 3A durchgeführten Bedingungen. Für die PCR-Amplifikation mit Adaptor-Oligonukleotiden wurden in getrennten Ansätzen mit zwei unterschiedlichen Oligonukleotiden (EcoR1-Adaptoroligonukleotid GATGTAATACGAATTCGACTCATAT bzw. MfeI-Adaptor-Oligonukleotid GATGTAATACAATTGGACTCATAT) jeweils 1/50 der aufgereinigten

20 Fragmente (Anlagerung bei 60°C 1 min; Verlängerung bei 72°C 2,5 min; Denaturierung 94°C 1min; 35-40 Zyklen) verwendet. Je 1 µl des Amplifikats wurden anschließend als Template in eine zweite Amplifikation unter identischen Bedingungen für 30 Zyklen überführt. Die amplifizierten Produkte wurden gelelektrophoretisch analysiert. Die beschriebenen PCR-Bedingungen führten zu einer Amplifikation mit Fragmenten unterschiedlicher Länge (200-

25 2500bp) (Abb. 2B). Alle Kontrollreaktionen, in denen kein DNA-Template eingesetzt wurde, blieben negativ. Anschließend wurden die amplifizierten Produkte aufgereinigt, mit EcoR1- bzw. MfeI-Restriktionsenzymen verdaut und in Lambda-ZAP-Express-Vektor (EcoR1-Fragment, Stratagene) ligiert. Die Kombination zweier unabhängiger Restriktionsenzyme erhöht die Diversifikation und die Wahrscheinlichkeit, dass immundominante Bereiche nicht

30 durch interne Restriktionsenzymchnittstellen zerstört werden und damit dem Nachweis entgehen. Nach Ligation der Nukleinsäurefragmente in die Vektoren wurden diese nach Standardtechniken in Lambda-Phagen verpackt. Dies erfolgte mit kommerziell erwerblichen Packaging Extrakten entsprechend den Herstellerangaben (z.B. Gigapack Gold III, Stratagene). Die so entstandenen Lambdaphagen-Bibliotheken (SE mit EcoRI-Adaptoren, SM für MfeI-Adaptoren) wurden ohne weitere Amplifikation im Immunoscreening analysiert.

35

## **Beispiel 4**

### **Immunoscreening und Identifikation von Antigenen**

Das Immunoscreening wurde wie bereits in Sahin et al. (1995), *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 11810-3; und Türeci et al. (1997), *Mol Med Today* 3, 342-349 beschrieben durchgeführt.

- 5 Bakterien des *E.coli* K12-abgeleiteten Stammes XL1 MRF wurden in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet, auf eine  $OD_{600}=0,5$  eingestellt und mit den Lambdaphagen der beschriebenen Expressionsbank infiziert. Die Anzahl der Plaque-bildenden Einheiten (plaque-forming-units, pfu) wurde derart eingestellt, dass eine Subkonfluenz der Plaques vorlag (z.B. ~5000 pfu/ 145 mm Petrischale). Unter Zusatz von TOP-Agar und IPTG wurde der
- 10 Infektionsansatz auf Agarplatten mit Tetrazyklin ausplattiert. Bei der Übernachtskultur bei 37°C bildeten sich auf dem Bakterienrasen Phagenplaques. Jeder einzelne Plaque repräsentiert einen Lambda-Phagen-Klon mit der in diesen Klon inserierten Nukleinsäure und enthält gleichzeitig das von der Nukleinsäure kodierte rekombinant exprimierte Protein.

- Nitrozellulosemembranen (Schleicher & Schüll) wurden aufgelegt, um Abklatschpräparate
- 15 der rekombinanten Proteine herzustellen (Plaque Lift). Nach Waschschritten in TBS-Tween und Blocken unspezifischer Bindungsstellen in TBS + 10% Milchpulver erfolgte die Inkubation im Serum des infizierten Wirtes über Nacht. Es wurde zu diesem Zweck gepooltes Serum der Infektionstage 16 und 30 verwendet und 1:100 – 1: 1.000 verdünnt. Nach weiteren Waschschritten wurden die Nitrozellulose-Membranen mit einem gegen Maus-IgG
- 20 gerichteten, sekundären AP-konjugierten Antikörper inkubiert. Bindungen von Serumantikörpern an in Phagenplaques rekombinant exprimierte Proteine konnten auf diese Weise durch eine Farbreaktion sichtbar gemacht werden. Klone, die als reaktiv mit Wirtsseren identifiziert wurden, konnten auf die Kulturplatte zurückverfolgt und von dort das entsprechende Phagenkonstrukt monoklonal isoliert werden. Nach erneuter Ausplattierung
- 25 wurden solche positiven Klone bestätigt. Durch *in vivo* Exzision wurde der Lambdaphagenklon zum Phagemid rezirkularisiert (Sahin et al. (1995), *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 11810-3).

- In beiden Banken (SE und SM) wurden wie oben geschildert insgesamt 150.000 Klone gescreent. Zu diesem Zweck wurde das gepoolte Serum der infizierten Tiere vom Tag 16 und
- 30 30 nach Infektion in einer Verdünnung von 1:500 verwendet. Primär identifizierte Klone wurden zunächst oligoklonal unter Zunahme von benachbarten nicht-reaktiven Phagenplaques isoliert und nach Bestätigung monoklonalisiert (Abb. 3). Es konnten 26 (SE-Bank) bzw. 41 (SM-Bank) Klone isoliert werden, die mit dem Serum der immunisierten Tiere reaktiv waren.

- Alle identifizierten Klone wurden zusätzlich mit Präimmunseren von Mäusen desselben
- 35 Stammes getestet und waren nicht reaktiv.

**Tabelle 2: Anzahl reaktiver Klone nach Screening der SE- und SM-Bank**

<b>Bank</b>	<b>gescreente Klone</b>	<b>reaktive Klone</b>
Bank SE	150.000	26
Bank SM	150.000	41

- 5 Die Sequenzierung und der Datenbankvergleich deckte unter anderem die drei folgenden unterschiedlich immunogenen Vacciniavirusproteine unter den Klonen auf:

39 kDa immunodominant antigen protein

- 10 Drei Klone kodieren für Bereiche aus dem 39-kDa Protein von Vacciniavirus (Abb.4A). Die Klone stellen Fragmente dieses Proteins dar. Sie beginnen alle bei Nukleotid 288, reichen aber unterschiedlich weit an das 3'-Ende dieses Genproduktes, nämlich bis Nukleotid 688, 788 bzw. 938.

- 15 Das für das 39-kDa Protein kodierende Gen ist der ORF A4L im Western Reserve (WR) Stamm (Maa und Esteban (1987), *J. Virol.* 61, 3910-3919). Das 281 Aminosäuren lange 39-kDa Protein ist in Menschen und Tieren stark immunogen (Demkovic et al. (1992), *J. Virol.* 66, 386-398).

- Es wurde bereits beschrieben, dass eine Immunisierung mit dem 39-kDa Protein eine schützende Immunität in Mäusen induzieren kann (Demkovic et al. (1992), *J. Virol.* 66, 386-398).
- 20

- Die stärkste antigene Domäne scheint innerhalb der letzten C-terminal gelegenen 103 Aminosäuren zu liegen (Demkovic et al. (1992), *J. Virol.* 66, 386-398). Die Lage der hier gefundenen Fragmente ist ebenfalls als Hinweis auf Sero-Epitope zu verstehen. Interessanterweise decken die beiden stark immunreaktiven Klone 2 und 3 den Bereich dieser als stark antigen beschriebenen 103 Aminosäuren ab.
- 25

- An diesem Beispiel wird auch die Multidimensionalität der Aussagen des erfindungsgemäßen Verfahrens deutlich. Neben der Identifizierung des gleichzeitig auch Immunschutz gewährenden Antigens ist durch die Anzahl überlappender Klone ein Hinweis auf die Abundanz der Antikörper gegeben. Die Lage der Klone erlaubt eine Einengung der Sero-Epitope sowie die Stärke der Reaktivität einen Hinweis auf die Avidität der Antikörper. Dies gilt ebenso auch für die im folgenden beschriebenen Antigene.
- 30



### A-type inclusion Protein (ATI)

Einige der hier gefundenen Klone repräsentieren das A-type inclusion protein (ATI) (Abb. 4B), ein ca. 160 kDa großes Protein bei verschiedenen Orthopoxviren (Patel et al. (1986), *Virology* 149, 174-189), das einen großen Anteil der Proteinmenge der charakteristischen Einschlusskörperchen ausmacht. Beim Vacciniavirus ist dieses Protein trunziert und nur ca. 94 kDa groß (Amegadzie (1992), *Virology* 186, 777-782). ATI assoziiert spezifisch mit infektiösem intrazellulären reifen Vacciniapartikeln und ist nicht in behüllten extrazellulären Vacciniaviren zu finden (Uleato et al. (1996), *J. Virol.* 70, 3372-3377). ATI ist eines der immundominanten Antigenen in Mäusen, wobei die immundominanten Domänen am Carboxyterminus des Moleküls liegen (Amegadzie et al. (1992), *Virology* 186, 777-782). Die drei hier gefundenen Klone, die identische Reaktionsstärken haben, decken den Bereich zwischen bp 308 und 1437 ab und sind entsprechend tatsächlich C-terminal bis zentral im kodierten Protein gelegen.

### Plaque size/host range (ps/hr) Protein

Das 38 oder 45 kDa große plaque size/host range Protein (ps/hr) wird durch den ORF B5R kodiert (Takahashi-Nishimaki et al. (1991), *Virology* 181, 158-164). ps/hr ist ein Typ 1 Transmembranprotein, das in die Membran von extrazellulären Viruspartikeln inkorporiert wird oder von Zellen während der Infektion sezerniert werden kann. Antikörper gegen ps/hr neutralisieren die Infektiosität des Vacciniavirus (Galmiche et al. (1999), *Virology* 254, 71-80). Deletion von ps/hr führt zur Attenuierung des Virus *in vivo* (Stern et al. (1997), *Virology* 233, 118-129). Ausserdem schützt die Immunisierung mit B5R gegen eine Infektion mit ansonsten tödlichen Dosen des Virus (Galmiche et al. (1999), *Virology* 254, 71-80). Drei der hier identifizierten Klone stellen Fragmente dar, die wiederum denselben Bereich dieses Antigens abdecken und den C-Terminus einschließen (Abb. 4C). Dies bedeutet, dass das von diesen Klonen repräsentierte Sero-Epitop im extrazellulären Bereich dieses viralen Oberflächenmoleküls liegt und somit gut für Antikörper zugänglich ist.

### Beispiel 5

#### Sequenzierung und bioinformatische Analyse der identifizierten Vacciniavirusantigene

Die Sequenzierung der identifizierten Klone erfolgte nach Standardtechniken mit Oligonukleotiden, die das Insert flankieren (BK-Reverse, BK-Universe) in Sanger'schen Kettenabbruchverfahren. Ermittelte Sequenzen wurden über BLAST-Analyse mit bekannten Sequenzen in der Genbank abgeglichen. Die Lokalisation der Vacciniavirusantigene im Genom (Accessionsnummer M35027) und die Standardnomenklatur ist in Tabelle 3 angegeben. Diese Analyse zeigt, dass über das gesamte Vacciniavirusgenom verteilte

Antigene mit dem erfindungsgemässen Verfahren identifiziert wurden. Bei einer grossen Anzahl der identifizierten Gene ist bisher nicht bekannt gewesen, dass die Genprodukte eine Wirkung als Antigen besitzen. Mit Hilfe des erfindungsgemässen Verfahrens werden daher nicht nur bekannte Antigene, sondern auch unbekannte Antigene identifiziert. Ein weiterer Vorteil des erfindungsgemässen Verfahrens ist, dass Antigene identifiziert werden können, die auf beiden Strängen (kodierender und komplementärer Strang) des Genoms zu finden sind.

10

**Tabelle 3: Identität, genomische Lokalisation, serologische Reaktivität und Anzahl der identifizierten Vacciniavirusantigene mit Hilfe des erfindungsgemässen Verfahrens.**

Vacciniavirus Antigene	Lokalisation in VV-Genom	SEQ ID NO:	Signal	# Klone
39 kDa immunodominant antigenic antigen (A4L)	ORF 151 (117270-116425)	4	++++	62
94 kDa A-type inclusion protein (TA31L)	ORF 174 (138014-135837)	5	+++	30
35 kDa plaque size/host range protein (B5R)	ORF 232 (167383-168336)	6	+++	7
116 kDa DNA polymerase (E9L)	ORF 80 (59787-56767)	7	+++	4
65 kDa envelope protein (F12L)	ORF 60 (43919-42012)	8	+++	2
62 kDa rifampicin resistance gene (D13L)	ORF 145 (113026-111371)	9	+++	1
32 kDa carbonic anhydrase-like protein (D8L)	ORF 137 (107120-106206)	10	+++	1
36 kDa late protein (I1L)	ORF 87 (63935-62997)	11	+++	1
16 kDa protein (TC14L)	ORF10 (10995-10567)	12	+++	1
38 kDa serine protease inhibitor 2 (B13R)	ORF 421 (172562-172912)	13	++	4
18 kDa protein (C7L)	ORF 24 (19257-18805)	14	++	3
24.6 kDa protein (B2R)	ORF 226 (163876-164535)	15	++	2
36 kDa protein (A11R)	ORF 164 (124976-125932)	16	++	1
15 kDa membrane phosphoprotein (A14L)	ORF 167 (126785-127128)	17	++	1
147 kDa protein (J6R)	ORF 117 (86510-90370)	18	++	1
77 kDa protein (O1L))	ORF 84 (62477-60477)	19	++	1
59 kDa protein (C2L)	ORF30 (24156-22618)	20	+	4

90 kDa protein (D5R)	ORF132 (101420-103777)	21	+	1
23 kDa protein (A17L)	ORF170 (129314-128703)	22	+	1

- 5 In der Abbildung 5 ist eine grafische Repräsentation des Vacciniavirusgenoms mit Darstellung der offenen Leseraster (ORF) zu finden, die zeigt, dass die durch das erfindungsgemäße Verfahren identifizierten Antigene über das gesamte Vacciniavirusgenom verteilt sind. Dies indiziert, dass das erfindungsgemäße Verfahren eine repräsentative Amplifikation von spezifischer Erregernukleinsäure aus geringsten Mengen von Ausgangsmaterial (1 – 20 pg) erlaubt.

### **Beispiel 6**

#### **10 Repräsentationsanalyse durch reversen Southern Blot**

Die repräsentative Amplifikation aus geringsten Mengen von Erregernukleinsäuren durch das erfindungsgemäße Verfahren wurde ebenfalls im folgenden Experiment gezeigt.

- 15 Zehn Genabschnitte des Vacciniavirusgenoms wurden ausgewählt und durch PCR-Reaktionen amplifiziert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung wurden die DNA-Fragmente über alkalischen Transfer auf Nylonmembranen geblottet. Radioaktive Hybridisierung wurde mit 20 ng nach dem erfindungsgemässen Verfahren hergestellter und mit <sup>32</sup>P markierter DNA durchgeführt. Abb. 6A zeigt, dass nur ein Teil der zehn zufällig ausgewählten Abschnitte des Genoms in der nach dem erfindungsgemässen Verfahren hergestellten DNA in einer einzelnen Re-PCR DNA enthalten sind. Werden mehrere Re-PCR
- 20 DNA, die in unterschiedlichen Ansätzen und unter variierten Bedingungen hergestellt wurden, kombiniert, ist die 100%ige Repräsentanz der zufällig ausgewählten Genabschnitte in der nach dem erfindungsgemässen Verfahren hergestellten DNA offensichtlich (Abb. 6B). Die unterschiedliche Abundanz der Nukleinsäuren, z.B. des 39 kDa Antigens (Abb. 6B, Spur 10), kann zumindest teilweise erklären, dass bestimmte Genabschnitte häufiger in der nach dem erfindungsgemässen Verfahren hergestellten DNA gefunden werden. Eine niedrige
- 25 Abundanz der DNA im Amplifikat schliesst aber eine häufige Detektion im Screening nicht aus, wie das Beispiel der A-type inclusion protein DNA (Abb. 6B Spur 2) zeigt.

### **Beispiel 7**

#### **Differentielle Serologie**

- 30 Lambdaphagen, deren rekombinante Inserts für Antigene kodierten, die durch Antikörper im Serum infizierter Mäuse erkannt werden, wurden auf Reaktivität mit Seren nicht infizierter Tiere (immunologisch naiv) und mit Seren von mit dem Lymphocytären Choriomeningitisvirus infizierten Mäusen getestet. Diese Studien wurden ebenfalls als Plaque-Lift Assay durchgeführt. Der Antikörpertiter und die spezifische Reaktivität der Seren gegen

Lift Assay durchgeführt. Der Antikörpertiter und die spezifische Reaktivität der Seren gegen die klonierten Antigene kann so einfach ermittelt werden. In Abb. 7A ist dargestellt, wie die Reaktivität eines am Tag 21 nach Infektion mit dem Vacciniavirus gewonnenen Serum gegen das 39 kDa Antigen ermittelt wurde. Zweifache Serumverdünnungen wurden mit durch Phagen in E. coli induziertes, rekombinantes 39 kDa Antigen inkubiert. Eine spezifische Reaktivität ist bei einer Serumverdünnung von 1:16000 noch erkennbar. Der zeitliche Verlauf der Antikörperreaktivität gegen das 39 kDa Antigen in mit Vacciniavirus infizierten, Lymphocytären Choriomeningitisvirus infizierten und in nicht infizierten Mäusen ist in Abb. 7B dargestellt. Der Verlauf der Antikörperantwort nach Vacciniavirusinfektion ist für diese Infektion typisch. Das Fehlen einer Reaktivität gegen das 39 kDa Antigen in naiven Mäusen und die nur sehr geringe Kreuzreaktivität nach Infektion mit dem Lymphocytären Choriomeningitisvirus zeigt die gute diagnostische Qualität, die mit durch das erfindungsgemäße Verfahren identifizierten Antigenen erreicht werden kann.

### **Beispiel 8**

#### **15 Identifikation von bakteriellen Antigenen mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens**

Zunächst wurden die Bedingungen erarbeitet, die eine Anreicherung von bakteriellen Erregern aus infizierten Proben erlauben. Hierzu wurde der Umstand genutzt, dass Bakterienwände widerstandsfähig gegenüber einer Lyse mit Solventien wie z.B. SDS sind. Durch eine SDS-Konzentrationsreihe wurde die Stabilität vom gramnegativen, grampositiven Bakterien und eukaryontischen Zellen bestimmt. Wie in Abbildung 8 dargestellt bleibt unter 1% SDS die korpuskuläre Struktur grampositiver Bakterien erhalten. Gramnegative Bakterien wie in diesem Beispiel E. Coli weisen immerhin eine Widerstandsfähigkeit gegen Lyse bis auf 0,1% SDS auf. Dagegen werden alle Membranstrukturen (Zytoplasma, Kern) von eukaryontischen Zellen, wie in diesem Fall Fibroblasten, vollständig aufgelöst. Die hohe SDS-Sensitivität von eukaryontischen Zellen wurden in anderen Beispielen auch für Leukozyten, Milzzellen, Lymphknotenbiopsien verifiziert. Nach Erarbeitung der Bedingungen wurde das erfindungsgemäße Verfahren für einen bisher nur unzureichend charakterisierten Erreger, Tropheryma whippelii, durchgeführt. Tropheryma whippelii ist ein gram-positives Bakterium und die Infektion mit diesem Erreger kann die Whipplesche Erkrankung auslösen. Die Whipplesche Erkrankung ist eine chronische Infektion verschiedener Organe mit der Hauptmanifestation im Darm, die unerkannt zum Tode führen kann. Dieser Erreger ist nur schwer in vitro anzüchtbar, so dass für molekulare Analysen nur geringste Mengen an spezifischer Nukleinsäure zur Verfügung stehen. Aufgrund dieser Probleme war die Analyse der antigenen Strukturen dieses Erregers bisher nicht möglich.

35 Durch das erfindungsgemäße Verfahren gelang es, potentielle Antigene dieses Erregers zu definieren. In der Abb 9 sind die wesentlichen Schritte, die zur Charakterisierung von Tropheryma whippelii spezifischen Antigenen geführt haben, dargestellt.

T. whippelii haltiges, homogenisiertes Gehirnmateriale eines an der Whippleschen Erkrankung verstorbenen Patienten wurde verwendet, um mit Interleukin-10 und Interleukin-4

deaktivierte Makrophagen zu inokulieren (Schoedon et al. (1997) J Infect Dis. 176:672-677). Am Tag 7 postokulationem wurden infizierte Makrophagen geerntet. und 25 µl des Makrophagen/Bakterien Gemischs wurden verarbeitet. Die differenzielle Zellyse erfolgte durch Inkubation der mit Bakterien infizierten Makrophagen in 1% SDS enthaltendem Proteinase K Puffer für 15 min mit 20 µg/ml Proteinase K bei 55°C. Durch diese Behandlung wurden die in der Mischung vorhandenen Makrophagen (eukaryontische Zellen) aufgelöst. Durch die Lyse der Makrophagen werden deren Nukleinsäuren (RNA, DNA) in die Lösung freigesetzt. Dagegen verbleiben die Nukleinsäuren der Bakterien durch Erhaltung der Integrität der grampositiven Bakterienwand in den Bakterienzellen. Nach der Inkubation mit SDS/Proteinase K wurden die Bakterien durch Zentrifugation der Suspension pelletiert. Dagegen liessen sich die Bakterien bei fehlendem Zusatz von Proteinase K aufgrund hoher Viskosität der Lösung schlechter pelletieren. Der Überstand mit den Nukleinsäuren der Makrophagen wurde verworfen und das kaum sichtbare Pellet mehrfach gewaschen. Nach den Waschschritten wurden pelletierte Bakterien in 100 µl Wasser resuspendiert und jeweils 10 µl der Suspension lichtmikroskopisch und nach Färbung mit dem DNA-Farbstoff DAPI in der Immunfluoreszenz zur Bestimmung der Bakterienzahl verwendet. Die Anzahl der aus 25 µl der infizierten Makrophagen isolierten Bakterien betrug nach mikroskopischer Auszählung ca. 4000-6000 DNA-haltige Partikel. Die residualen 80 µl angereicherten Bakterien wurden zur Gewinnung von bakteriellen Nukleinsäuren nach Standardtechniken (Kochen, Denaturierung, DNA-Isolation mit Phenol/Chloform) weiterverarbeitet. Die Menge der aus den Bakterien isolierten DNA konnte aufgrund der niedrigen Menge nicht experimentell quantifiziert werden (kein detektierbares Signal im EtBr-Gel). Aufgrund der licht- und immunfluoreszenzmikroskopisch ermittelten Bakterienzahl (max. 6000) wurde bei einer angenommenen Bakteriengenomgrösse von 1-2 Mio Basen doppelsträngige DNA eine maximalen Ausbeute von 6-12 pg Erreger-DNA kalkuliert (Für die Kalkulation wurde das Durchschnittsgewicht eines Nukleotids von 660 eingesetzt). 50% der extrahierten DNA (d.h. max. 3-6 pg) wurde wie nach dem erfindungsgemässen Verfahren beschrieben (Klenow, sequentielle PCR, Re-PCR) amplifiziert und aus den amplifizierten Fragmenten eine genomische Bibliothek in Lambda-ZAP-Express-Vektor (Stratagene) hergestellt. Das Immunoscreening wurde mit Seren von T. whippelii infizierten Patienten durchgeführt. Positive Klone wurden sequenziert und bioinformatisch analysiert. Als Beispiel ist in Abb. 8 ein Klon aufgeführt, der sowohl für ein bakterielles putatives Lipoprotein als auch für ein putatives Histidine triad protein kodiert.

Dieses Beispiel zeigt, dass das erfindungsgemässe Verfahren neben der Identifikation von viralen Antigenen auch geeignet ist, bakterielle Antigene zu identifizieren.

#### **Beispiel 9: Anreicherung von Whipple Bakterien aus einer infizierten Milzprobe eines Patienten mit systemischer Infektion.**

Jeweils 20 µl einer kryopräservierten Milzprobe eines Patienten mit Morbus Whipple wurden unter fünf leicht modifizierten Bedingungen zur Anreicherung von Bakterien verwendet

(insgesamt 100 µl). Hierzu wurden die Milzproben wie im Beispiel 8 beschrieben in 1,5 ml Proteinase K Puffer mit 20 mg/ml Proteinase K Zusatz 10-60 min bei 55°C inkubiert. Danach wurden die in den infizierten Milzprobe befindlichen Bakterien wie im obigen Beispiel beschrieben durch Zentrifugation angereichert und mikroskopisch wie vorher beschrieben dokumentiert. Abbildung 10 zeigt eine Aufnahme einer bakterienreichen Pelletfraktion. Anschliessend wurden die Bakterien durch Kochen in GITC-Puffer und Ultraschallbehandlung aufgeschlossen und die bakteriellen Nukleinsäuren über Standardverfahren isoliert. Wie erwartet, war die Menge der Nukleinsäuren, die aus den angereicherten Fraktionen isoliert wurden, unter der Nachweisgrenze von 1 ng. Zur Dokumentation der bakteriellen Anreicherung wurden jeweils 1/100 der isolierten Nukleinsäuren für eine PCR-Amplifikation mit Whipple-Bakterien (Sequenz noch einfügen) bzw. human-DNA (Sequenz noch einfügen) spezifischen Oligonukleotiden eingesetzt und über 37 Zyklen amplifiziert. Abbildung 11A zeigt die Amplifikations-Resultate (A: PCR spezifisch für Whipple Bakterien, B: PCR spezifisch für humane DNA). Die Ergebnisse sind dargestellt für Amplifikationsbanden der Bakterien-angereicherten Fraktionen (Spur 1-3) bzw. von aus der nicht-angereicherten Fraktionen (Spur 4-6). Während in den nicht-angereicherten Fraktionen wie erwartet die Amplifikationssignale für humane DNA deutlich stärker sind (Spur 4-6) zeigen besonders Fraktionen 1 und 2 fast ausschliesslich eine Amplifikation von Erregernukleinsäuren. Das Beispiel zeigt das die geringe Menge des benötigten Materials es ermöglicht, die Anreicherungsbedingungen leicht zu variieren und anschliessend mit der am stärksten angereicherten Erreger-Fraktion (in diesem Fall 1 und 2) das erfindungsgemässe Verfahren fortzusetzen.

**Beispiel 10:** Globale Amplifikation von Erregernukleinsäuren aus direkt aus einer Milzprobe isolierten DNA. Die nach dem erfindungsgemässen Verfahren wie im Beispiel 9 dargestellt isolierten Erregernukleinsäuren wurden wie im Beispiel 3 beschrieben amplifiziert und aus den amplifizierten Fragmenten eine genomische Bibliothek in Lambda-ZAP-Express-Vektor (Stratagene) hergestellt. Das Immunoscreening wurde mit Seren von T. whippelii infizierten Patienten durchgeführt. Positive Klone wurden sequenziert und bioinformatisch analysiert.

**PATENTANSPRÜCHE**

1. Verfahren zur Identifizierung von durch das Genom von mikrobiellen Erregern  
5 kodierte biologisch aktiven Strukturen ausgehend von genomischen Erregernukleinsäuren,  
umfassend die Schritte
- (a) Gewinnung von genomischen Erregernukleinsäuren aus erregerehaltigen  
Proben,
  - (b) Sequenzunabhängige Amplifikation von genomischen  
10 Erregernukleinsäuren,
  - (c) Expression amplifizierter Erregernukleinsäuren, und
  - (d) Screening und Identifizierung der biologisch aktiven Struktur.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die durch das  
15 Genom von mikrobiellen Erregern kodierte biologisch aktive Strukturen durch das Genom  
eines bakteriellen Erregers kodiert werden.
3. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die durch das  
20 Genom von mikrobiellen Erregern kodierte biologisch aktive Strukturen durch das Genom  
eines DNA-haltigen Virus kodiert werden.
4. Ein Verfahren gemäß Anspruch 1-3, wobei der mikrobielle Erreger ein  
intrazellulärer viraler oder bakterieller Erreger ist.
- 25
5. Ein Verfahren gemäß Anspruch 1-3, wobei der mikrobielle Erreger ein  
extrazellulärer viraler oder bakterieller Erreger ist.
6. Ein Verfahren gemäß den Ansprüchen 1-3, wobei der mikrobielle Erreger  
30 nicht-vital und/oder nicht-infektiös ist.
7. Ein Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei die biologisch aktive Struktur ein  
Erregerantigen ist.

8. Ein Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei die biologisch aktive Struktur ein Pathogenitätsfaktor des mikrobiellen Erregers ist.

9. Ein Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei die biologisch aktive Struktur ein enzymatisch aktives Protein ist.

10. Ein Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei zur Identifikation 10-20 pg Erregernukleinsäure verwendet werden.

11. Ein Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei zur Identifikation 1-10 pg Erregernukleinsäure verwendet werden.

12. Ein Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei die Proben Blut, Gewebe, kultivierte Zellen, Serum, Sekret aus Läsionen und andere Körperflüssigkeiten umfassen.

13. Ein Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei die Gewinnung von genomischen Erregernukleinsäuren aus erregerehaltigen Proben in Schritt (a) die folgenden Schritte umfasst:

(a<sub>1</sub>) Freisetzung von Erregerpartikeln aus erregerehaltigen Proben

*optional* (a<sub>2</sub>) Elimination und/oder Reduktion kontaminierender

Wirtsnukleinsäuren

und (a<sub>3</sub>) Extraktion der genomischen Erregernukleinsäure aus freigesetzten Erregerpartikeln.

14. Ein Verfahren gemäß Anspruch 13, wobei die Freisetzung von Erregerpartikeln in Schritt (a<sub>1</sub>) durch Zellyse, Sedimentation, Zentrifugation und/oder Filtration erfolgt.

15. Ein Verfahren gemäß Anspruch 13, wobei die Elimination und/oder Reduktion kontaminierender Wirtsnukleinsäuren in Schritt (a<sub>2</sub>) durch RNase- und/oder DNase-Verdau erfolgt.

16. Ein Verfahren gemäß Anspruch 13, wobei die Extraktion der genomischen Erregernukleinsäure in Schritt (a<sub>3</sub>) durch Abtrennung des genetischen Materials des Erregers



von korpuskulären Bestandteilen des Erregers durch Proteinase K-Verdau, Denaturierung, Lysozym-Behandlung oder organische Extraktion erfolgt.

17. Ein Verfahren gemäss Anspruch 1, wobei die sequenzunabhängige  
5 Amplifikation der genomischen Erregernukleinsäure in Schritt (b) durch Klenowreaktion mit Adaptoroligonukleotiden mit degeneriertem 3'-Ende und nachfolgender PCR mit Oligonukleotiden, die der Adaptorsequenz entsprechen, erfolgt.

18. Ein Verfahren gemäss Anspruch 1, wobei die Amplifikation der  
10 Erregernukleinsäure in Schritt (b) durch reverse Transkription mit degenerierten Oligonukleotiden und nachfolgender Amplifikation durch PCR erfolgt.

19. Ein Verfahren gemäss Anspruch 1, wobei die Amplifikation der  
15 Erregernukleinsäure in Schritt (b) durch reverse Transkription mit degenerierten Oligonukleotiden und nachfolgende Amplifikation mit T7 RNA Polymerase erfolgt.

20. Ein Verfahren gemäss Anspruch 1, wobei zur Expression von amplifizierten Erregernukleinsäuren in Schritt (c) ein Einbringen der Erregernukleinsäuren in Vektoren und Verpackung der Vektoren in Lambda-Phagen erfolgt.

20

21. Ein Verfahren gemäss Anspruch 1, wobei zur Expression von amplifizierten Erregernukleinsäuren in Schritt (c) ein Einbringen der Erregernukleinsäuren in filamentöse Phagen-Vektoren erfolgt.

22. Ein Verfahren gemäss den Ansprüchen 20 und 21, wobei die Vektoren  
25 ausgewählt sind aus der Gruppe der viralen, eukaryotischen oder prokaryotischen Vektoren.

23. Ein Verfahren gemäss Anspruch 1, wobei das Screening ein Immunoscreening  
30 auf Erregerantigene darstellt und die Identifizierung von Erregerantigenen in Schritt (d) die folgenden Schritte umfasst:

(d<sub>1</sub>) Infektion von Bakterien mit Lambda-Phagen,

(d<sub>2</sub>) Kultivierung der infizierten Bakterien unter Bildung von Phagenplaques,

- (d<sub>3</sub>) Transfer der Phagenplaques auf eine Nitrozellulosemembran oder einer anderen Festphase, die zur Immobilisierung von rekombinanten aus den Erregern abgeleiteten Proteinen geeignet ist,
- 5 (d<sub>4</sub>) Inkubation der Membran mit Serum oder antikörperhaltigen Körperflüssigkeiten des infizierten Wirtes,
- (d<sub>5</sub>) Waschen der Membran,
- (d<sub>6</sub>) Inkubation der Membran mit sekundärem AP-gekoppeltem anti-IgG-Antikörper der spezifisch für Immunglobuline des infizierten Wirtes ist.
- (d<sub>7</sub>) Nachweis der mit Wirtsserum reaktiven Klone durch Farbreaktion, und
- 10 (d<sub>8</sub>) Isolierung und Sequenzierung der reaktiven Klone.

24. Ein Verfahren gemäss Anspruch 1, wobei das Screening ein Immunoscreening auf Erregerantigene darstellt und die Identifizierung von Erregerantigenen in Schritt (d) die folgenden Schritte umfasst:

- 15 (d<sub>1</sub>) Generierung von rekombinanten filamentösen Phagen durch Einbringen der filamentösen Phagenvektoren in Bakterien,
- (d<sub>2</sub>) Inkubation generierter rekombinanter filamentöser Phagen mit Serum eines infizierten Wirtes,
- 20 (d<sub>3</sub>) Selektion der filamentösen Phagen, an die Immunglobuline des Wirts gebunden haben, über immobilisierte Reagentien die spezifisch für die Immunglobuline des infizierten Wirts sind, und
- (d<sub>4</sub>) Isolierung und Sequenzierung der selektierten Klone.

25 25. Ein Verfahren gemäss Anspruch 1, wobei der mikrobielle Erreger vor Gewinnung der Nukleinsäuren durch Fällung mit Polyethylenglykol, Ultrazentrifugation, Gradientenzentrifugation oder durch Affinitätschromatographie angereichert wird.

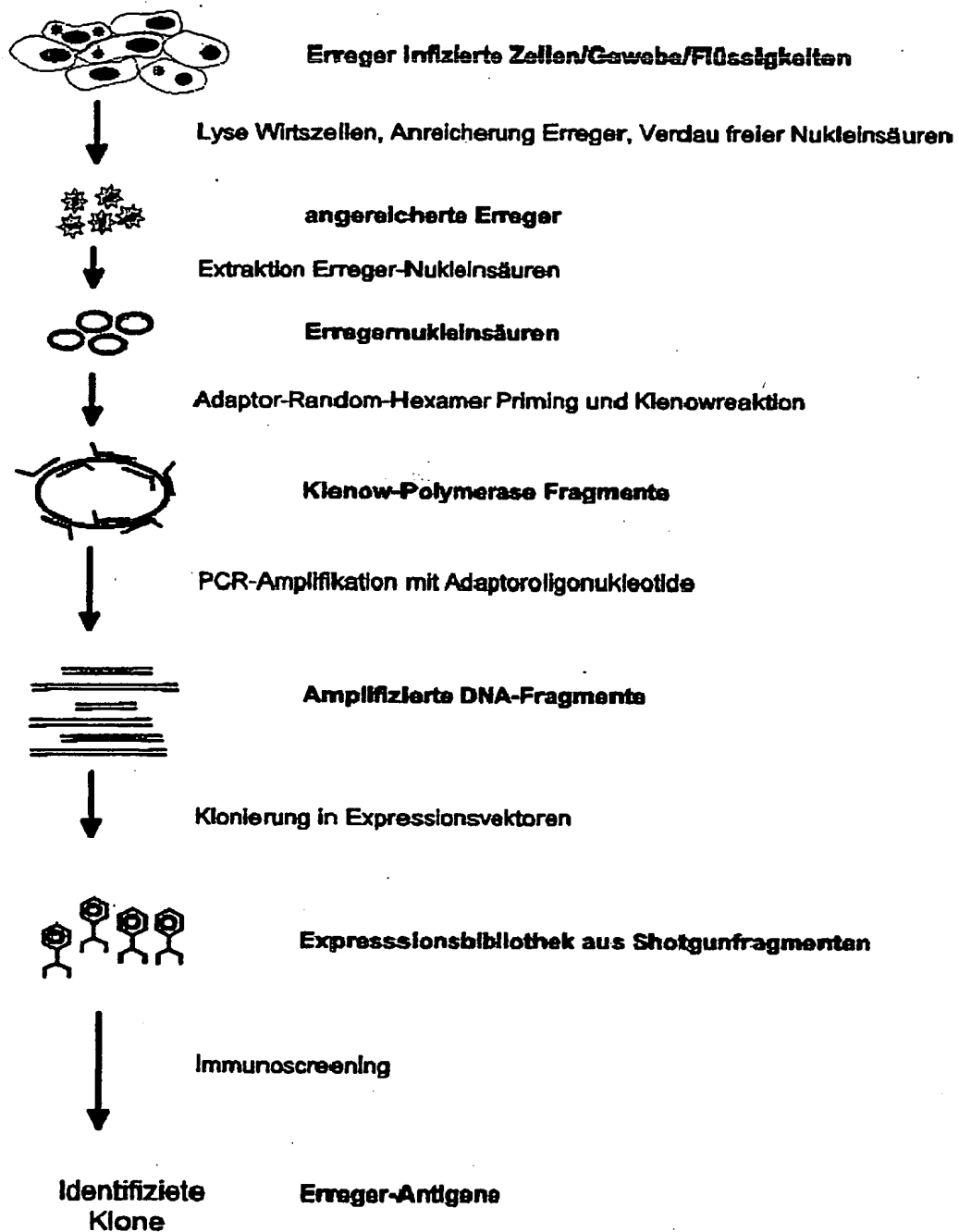
26. Vaccinavirusantigen, dadurch gekennzeichnet, dass das Antigen von einer Nukleinsäure codiert wird, die 80% Homologie zu einer der Sequenzen SEQ ID NOS: 4,5,6,7,8,9,10, 11,12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 oder 22 aufweist.

30 27. Vaccinavirusantigen nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, dass das Antigen von einer Nukleinsäure codiert wird, die 90% Homologie zu einer der Sequenzen SEQ ID NOS: 4,5,6,7,8,9,10, 11,12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 oder 22 aufweist.

35 28. Vaccinavirusantigen nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, dass das Antigen von einer Nukleinsäure codiert wird, die 95% Homologie zu einer der Sequenzen SEQ ID NOS: 4,5,6,7,8,9,10, 11,12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 oder 22 aufweist.

29. Vaccinavirusantigen nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, dass das Antigen von einer der Nukleinsäuren SEQ ID NOS: 4,5,6,7,8,9,10, 11,12, 13, 14, 15, 16 ,17, 18 ,19, 20, 21 oder 22 codiert wird.

Fig. 1



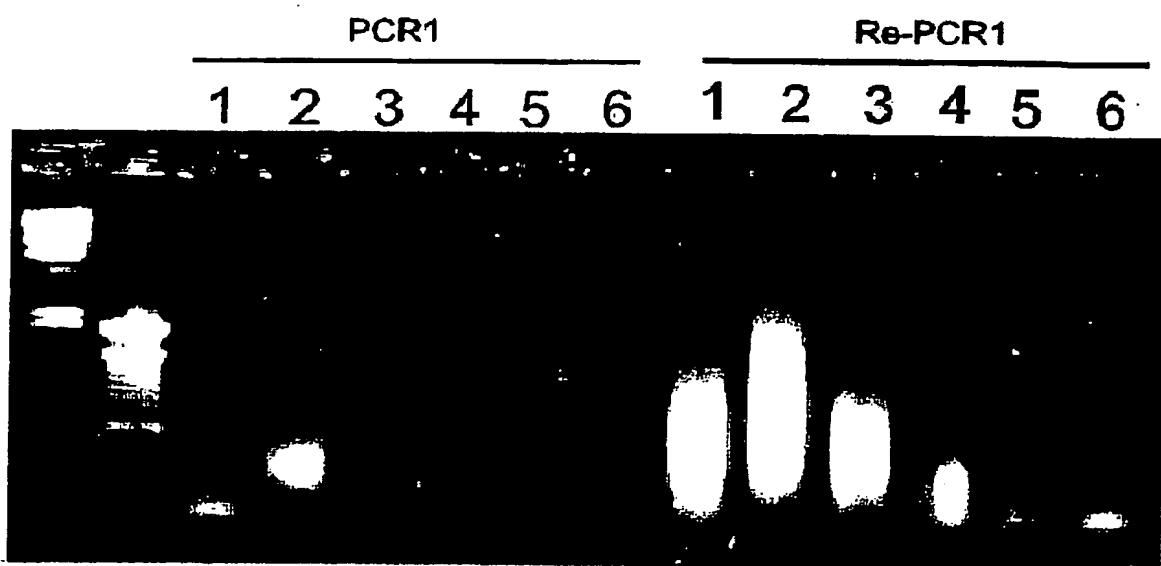


Abbildung 2A

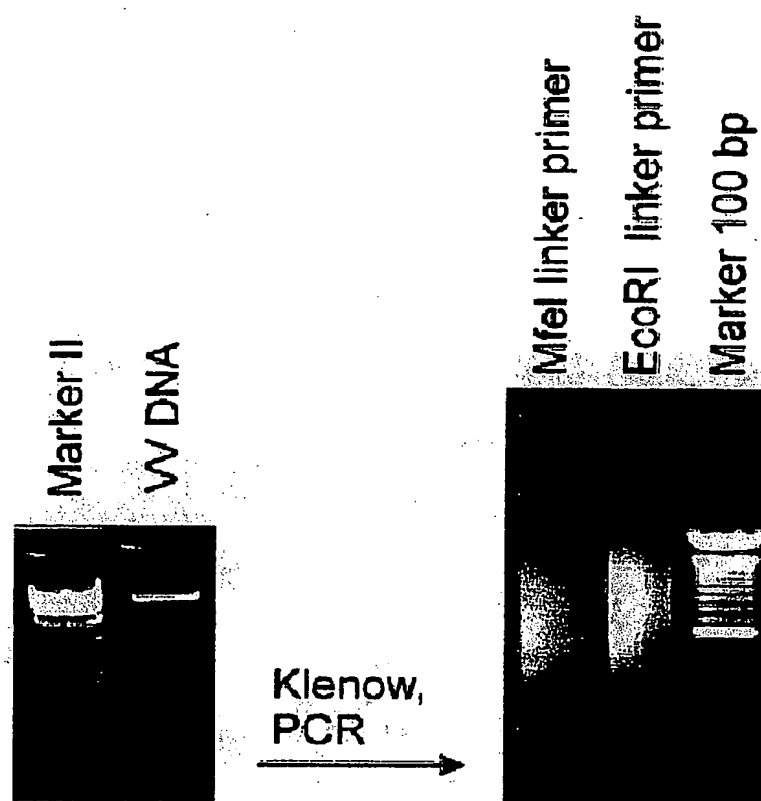


Abbildung 2 B

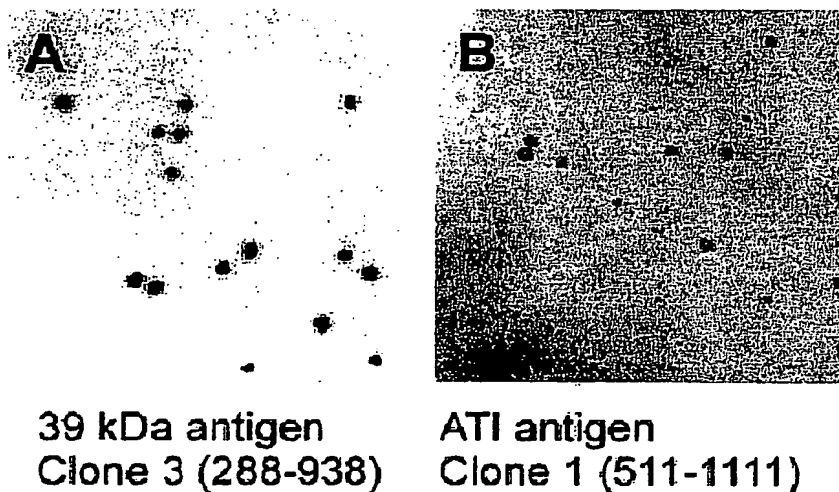


Abbildung 3

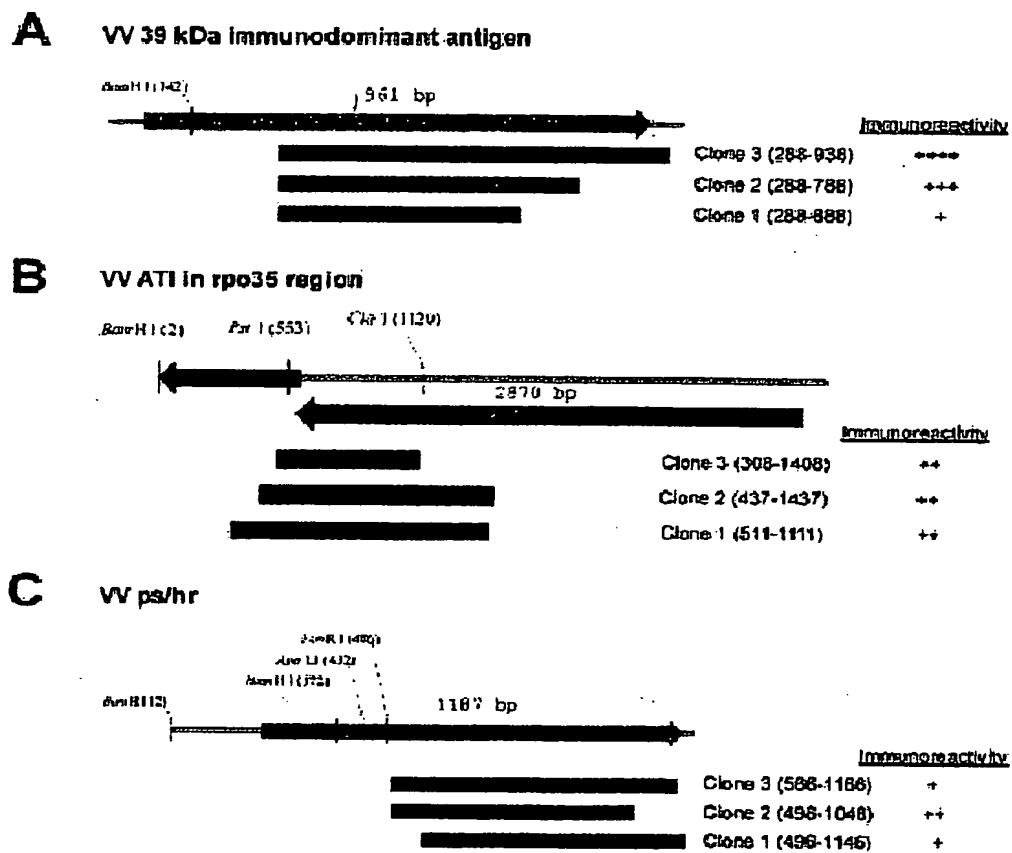


Abbildung 4



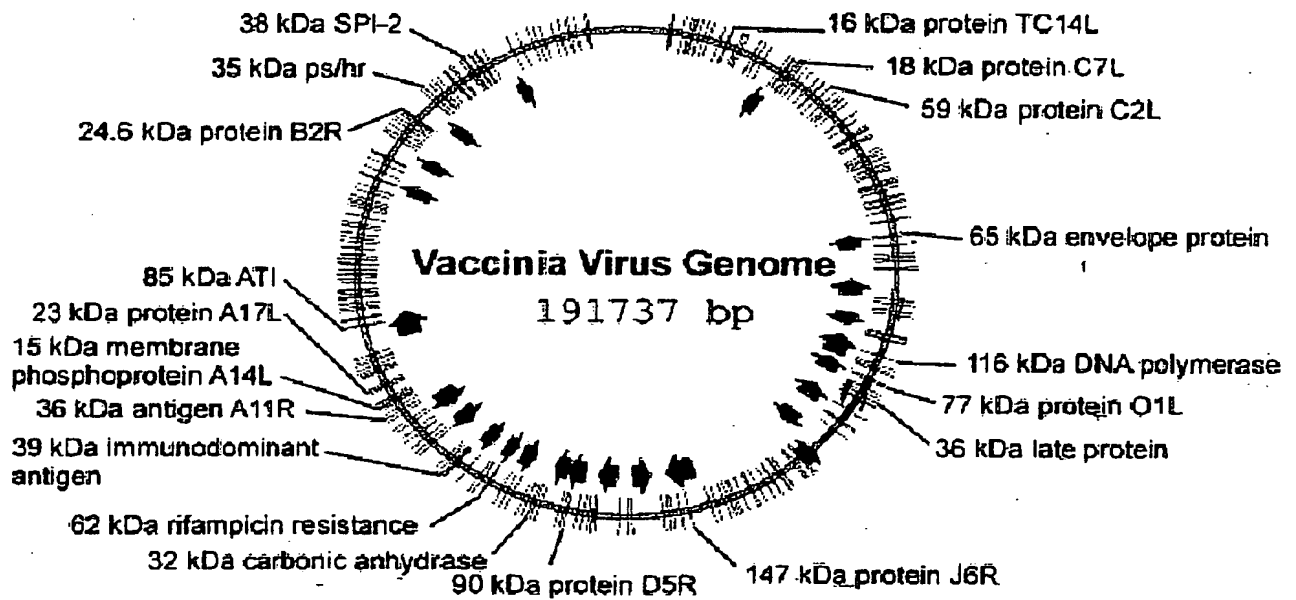


Abbildung 5

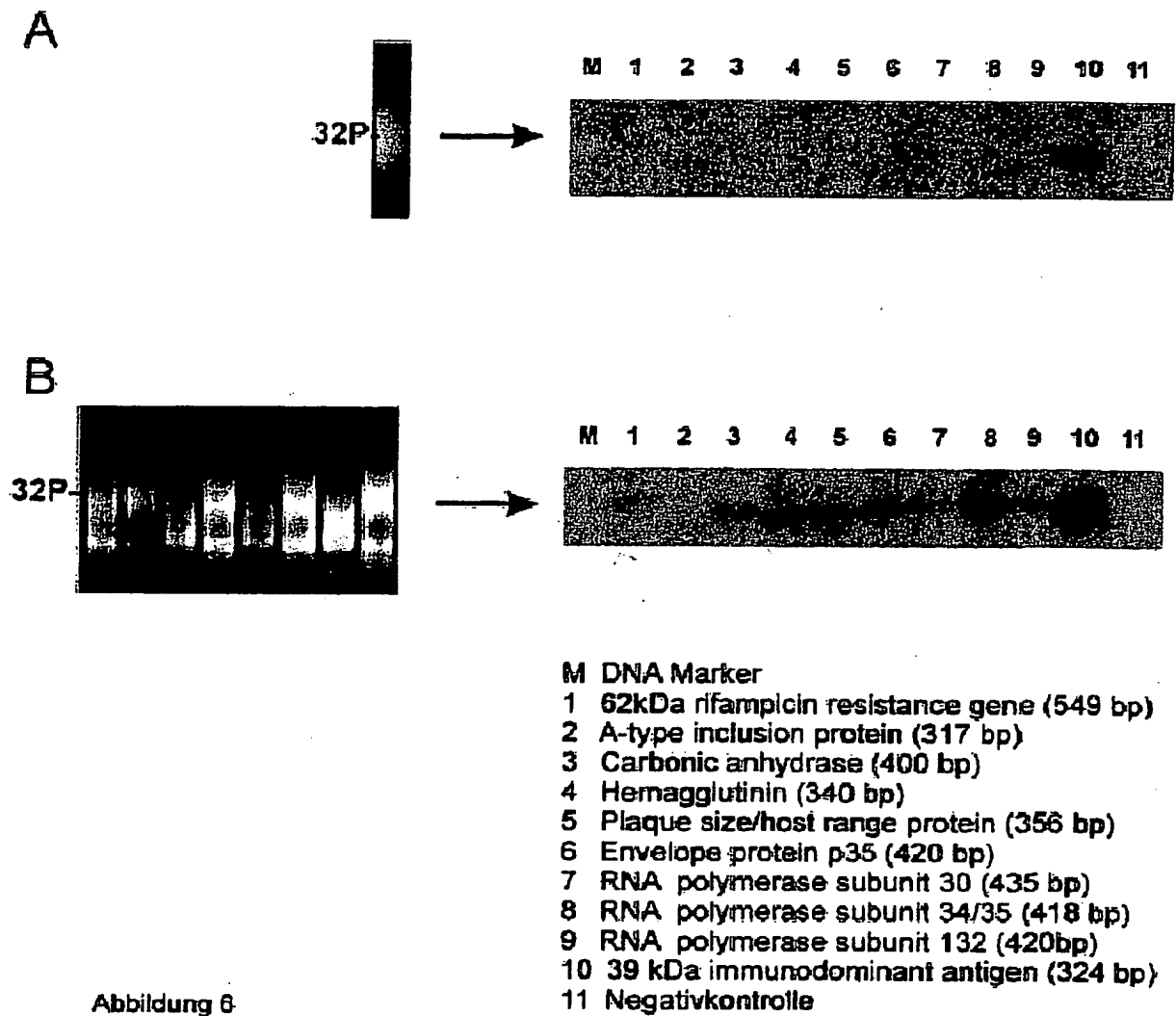
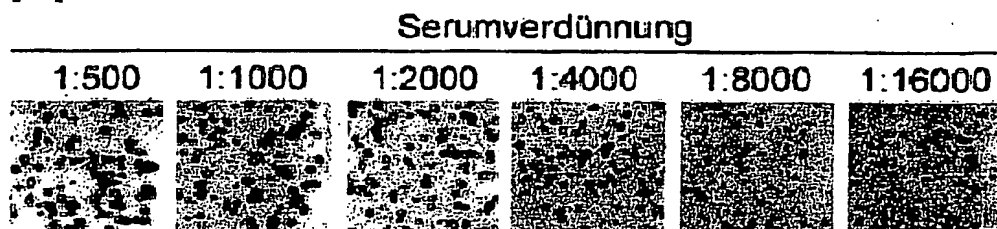


Abbildung 6

**A**

=> Anti-Vacciniavirus 39 kDa antigen Titer: >1:16.000

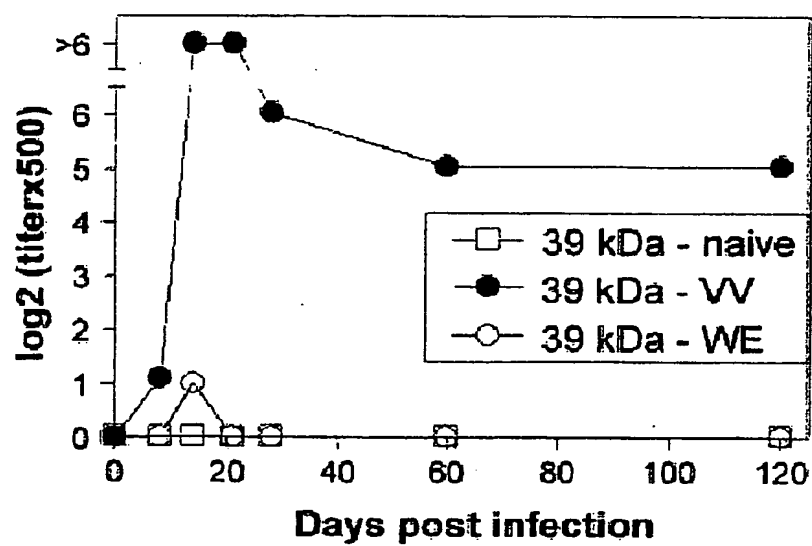
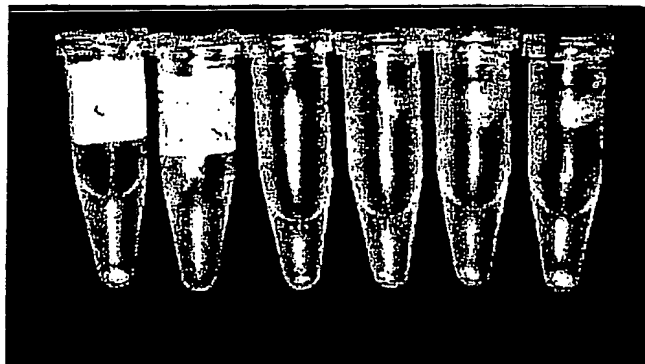
**B**

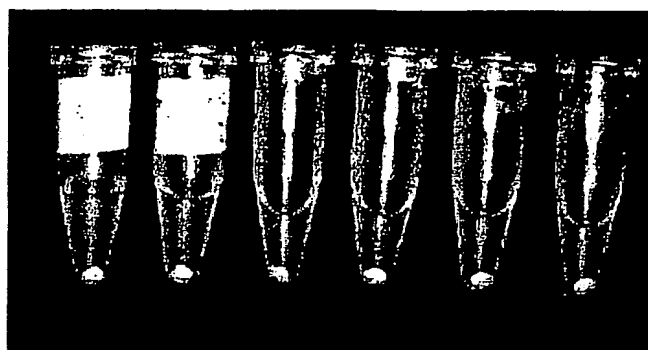
Abbildung 7

# SDS

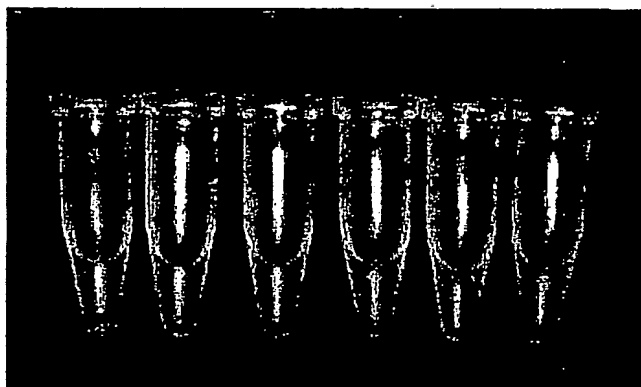
0% 1% 0,5% 0,2% 0,1% 0,05%



Gramnegative  
Bacteria



Grampositive  
Bacteria



Eucaryotic  
Cells

Abbildung 8

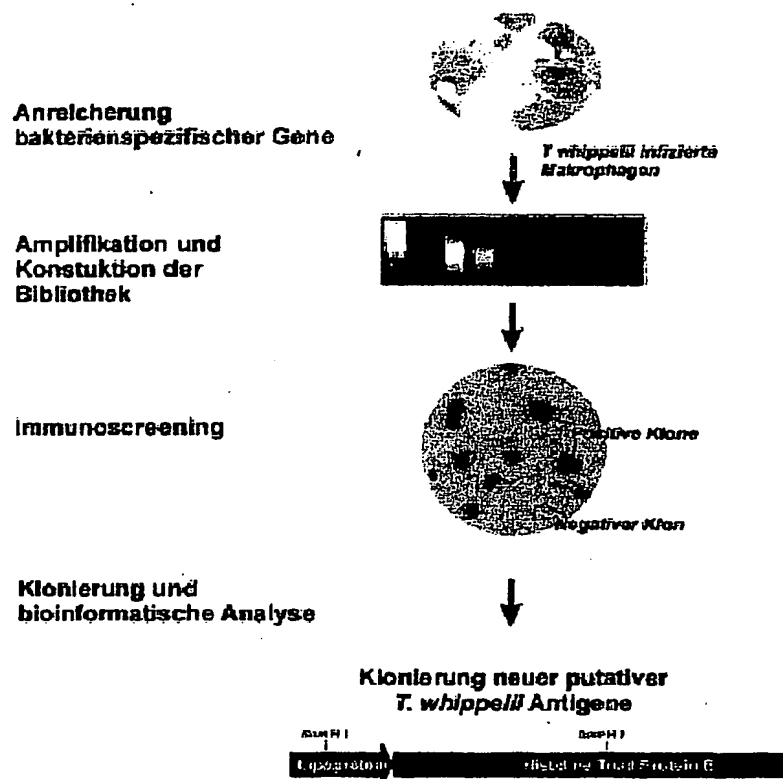
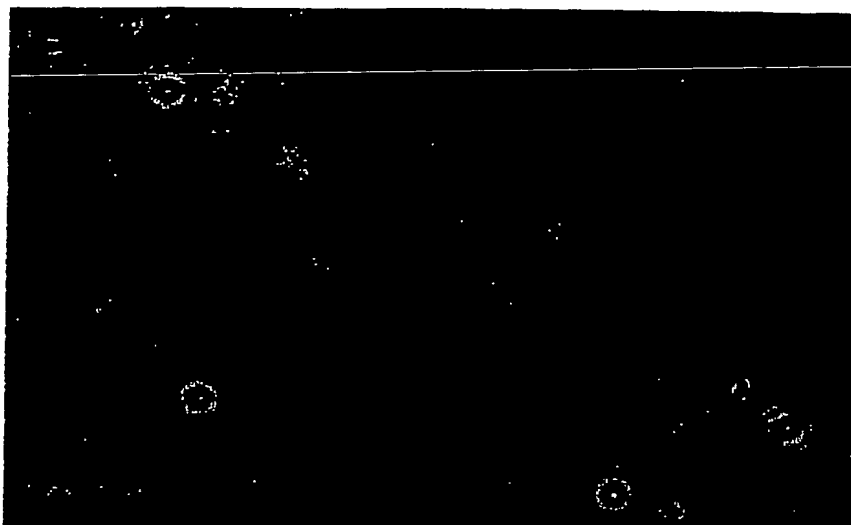


Abbildung 9

**A**



**B**



**Abbildung 10**

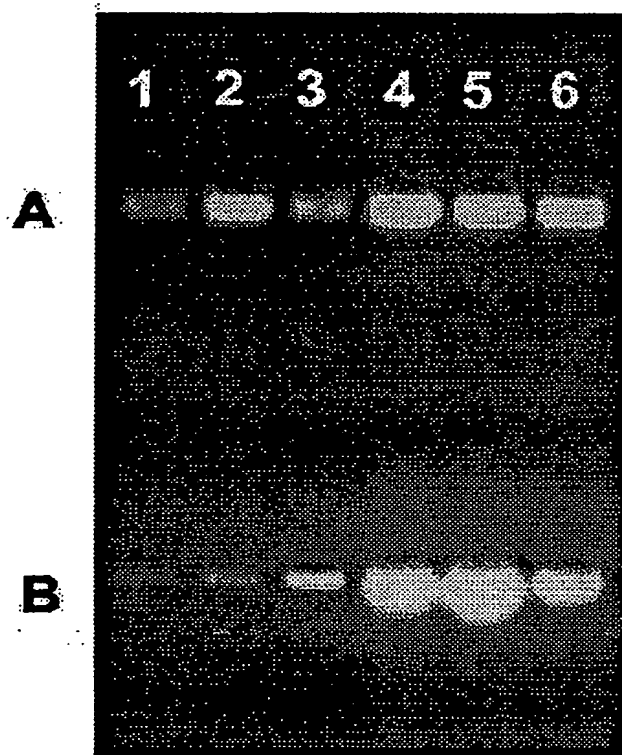


Abbildung 11A

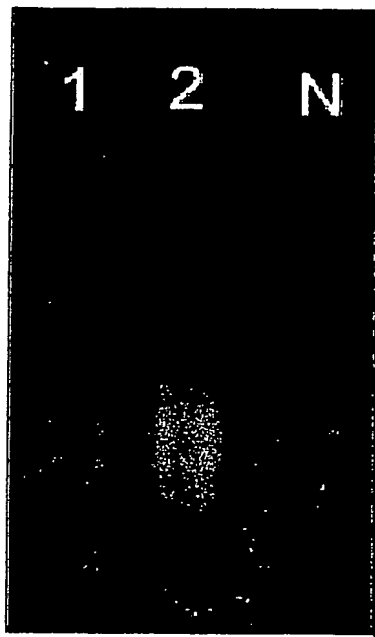
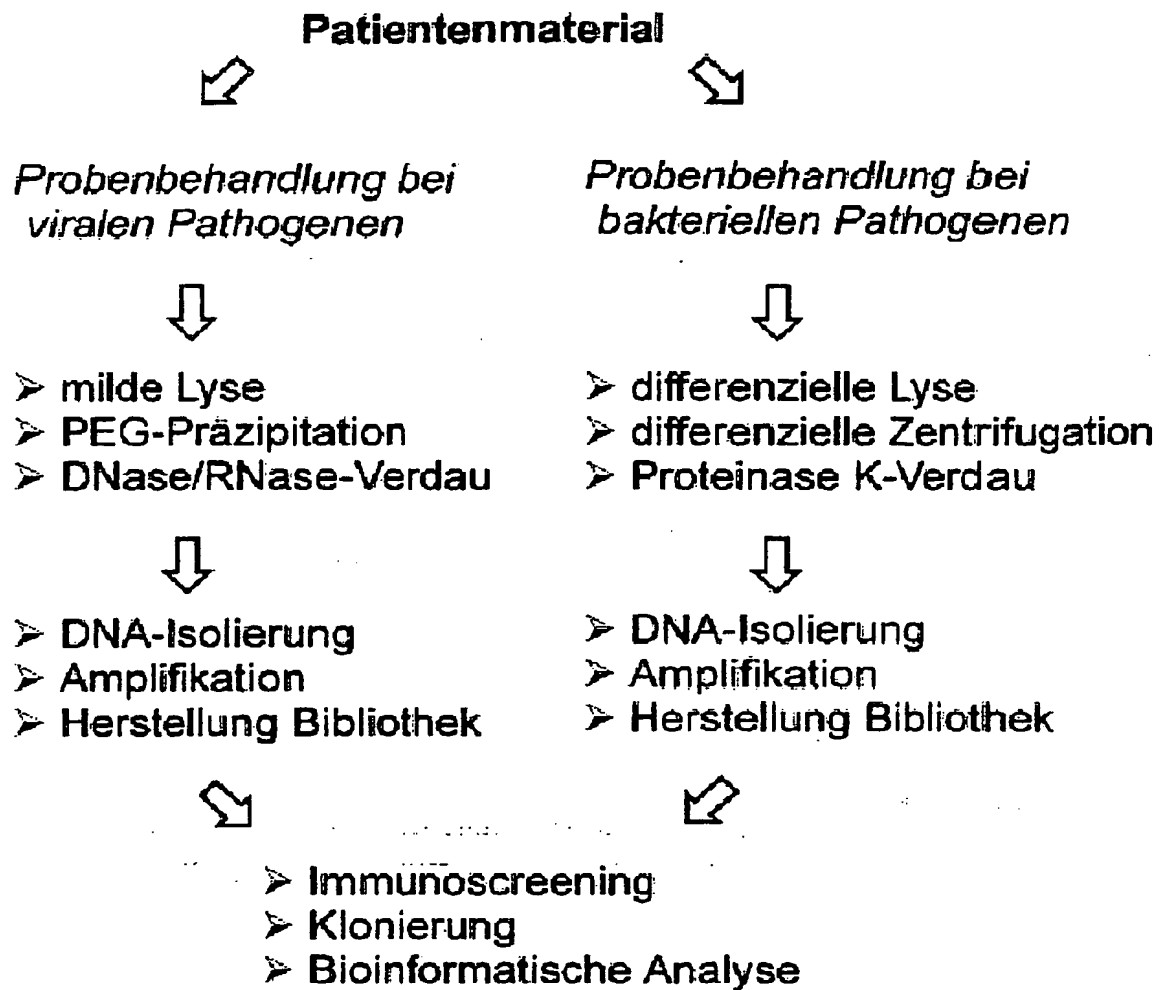


Abbildung 11B



**Abbildung 12**

**Abbildung 13**

Vacciniavirus Antigene	Lokalisation in VV-Genom	Signal	# Kl on e
39 kDa immunodominant antigenic antigen ORF 151 (117270-116425) (A4L)		++++	62
ttacttttggaaatcggtcaaaaccttgactagttgtagaatttgatctattgccctacgcgtatactcccttgcacatatacggttcgtcacca atcggtttgttcggcctgaagttggtgcatactttttcaacactcgacatgagatccttaaggccatatacgctctagattttgttgagatgctg ctcctggatttggattttgtgtgctgtgtacatactgtaccaccagtaggtgtaggagtacatacagtggccacaataggagggtgagga ggtgtaaccgttggagtagtacaagaaatattccatccgattgtgtgtacatgtagttgttgtaacgtctgagaagggtgggtagatgg cggcgtcgtcgtttttgatctttattaaatttagagataatatcctgaacagcattgctcggcgtcaacgctggaaggagtgaactcgccg gcgcatcagtatcttcagacagccaatcaaaaagattagacatacagatgatgtattagttgtgtcgtggttttggtgtaggagcagta tactaggtagaagaataggagccggtgtagctgttggaaccggctgtggagttatatgaatagttggtttagcggttgataggctgtc gctggcggccatcatattatctctagctagttgttctcgcaactgtcttgataatacgactcttgagacttttagtcctatttcaatcgcttcac cttttcgtatccggatccttttctcagaataatagattgacgactttggtgtagaggattctgccagcccctgtgagaactgttaaagaag tccat			
94 kDa A-type inclusion protein (TA31L)	ORF 174 (138014-135837)	+++	30

ctaagacgtcgcacatctctctgtttcggcattggtttcattattacgtctacagtcgttcaactgtcttcaagatctgatattctagattggag  
ctgctaattctctgtagcattttcacggcattcactcagttgtctttcaagatctgagattttagattggagctgctaattctctgtaagatttctt  
ctccgctctcgcagtcggtcaacttattctctagttcttaatacgcgaacgcagtcgcatcaactcttgcgtgtcttcctggttgcgtgt  
acattcatcgagtcgagattcgaatcttaacgcgctcgttcttctcaagttctctgcgtactacagaaagcgtgtccctatcttgttga  
tatttagcaatttctgattctagagtactgattttgcttacgttagtactaattttgtcttggccttatcaagatcctccttgtatttgcgcattc  
tgatatccctacgaagtcgtgacagttccattcgacattacgacgtttatcgatttcagctcggagatcgtcatcgctgttgttttagccaca  
tacgactgagttcaagttctcgttgacaagatccatctattttccattcctaatagtatccagttccttttctagttctgaacgcatttctcggtc  
cctatcaagcgatttctcaattctcggatagttcttctatcaatttctaataatctgaaccatcatctgtcccattttgaatatccctgtgttct  
tgatctcttttgtaagtcggctgattcttctgggtttataaacagaatccctttccaaagtcctaattcttactgagtttatcactaagttctgcatt  
aattcgggtgagttttcttggcttcttccaaactctgttttaaaactctccactatttccgcatttctcctcgcatatttctaaccattcaattagttta  
taataactagtttgtaacagcgattcctatagccgttcttgaattgtgggaacataaattaggatcttctaattggtttagttggtttagtagc  
tcatctttatcattattagggggatggacaaccttaattgggttggctcctcatctcctccagtagcgtgtggttcttcaataaccagtgttagta  
aggcttaggcaaatgcttctgtagcggcacttccatccatcaagtatttataatcgggttctacttcagaatattcttttctaagagac  
gcgacttcgggagttagtagaagaactctgtttctgtatctatcaacgctggaatcaatactcaagttaaggatagcgaatacctcatcgtc  
atcatccgtatcttctgaaacacccatcatatgacatttcatgaagtctaactgtattgataaataagatcagatttagtattaaacagatccttaa  
ccttttttagtaaacgcataatgtatatttttagatctccagatttcataatgatcacatgccttaaatgtcagtgcttccatgatataatctggaa  
cactaatgggtgatgaaaaagataccggaccatagctacgttgataaataactctgaaccactaagtagataatgattaatgtaaggaa  
gaggaaatattcagtatataggtatgtcttggcgctatcttgtactaaacacgctaaacagtttgtaattgtatcaatttccaatagattaa  
ttagagcagcaggaataccaacaacatattaccacatccgtattttctatgaatatcacatatcatgttaaaaaatcttgatagaagagcg  
aatatctcgtctgacttaagagtcgtagttcagcagcaacataagtcataactgtaaatagaacatacttctcgtagtagtattgattctagact  
ccgcatcaacaccattattaaaaatagttttatatacatctttaatctgctcctcggttaactcgtcgaacggtttagtatacggaaacactttgatt  
tcttatctgtagttaatgacttagtgatacacgaagaatattacgaattacatttctgttttcttgagagacatgattcagaactcaactcat  
gttccatagttttctacctcagttggcgaaatcttggagtgcttggtagattttcaataaggttcgtgacctcat

35 kDa plaque size/host range protein (B5R): ORF 232 (167383-168336) +++ 7

Atgaaaacgatttccgttgttacgttgttatgcgtactacgtgctgttatttcaacatgtactgtaccactatgaataacgctaaattaac  
gtctaccgaaacatcgtttaataataaccagaaagttacgtttacatgtgatcaggatattcattctcggatccaaatgctgtctgcgaaac  
agataaatggaaatacgaataatccatgcaaaaaaatgtgcacagtttctgattacatctctgaactatataataaaccgctataggaagt  
aattccaccatgacactaagttgcaacggcgaaacaaaatatttctgtgcgaagaaaaaatggaaatacttcttggaaatgatactgttac  
gtgtcctaatgcggaatgtcaaccttcaattagaacacggatcgtgtcaaccagttaaagaaaaatactcatttggggaatataatgacta  
tcaactgtgatgttgatagaggttattggtgcttctacataagttgtacagctaattcttggaaatgttattccatcatgtcaacaaaaatgt  
gatataccgtctctatctaatggattaatttccggatctacattttctatcgggtggcgttatacatcttagttgtaaaagtgggtttataactacg  
gatctccatcatccacatgtatcgacggtaaatggaatcccgctactcccaatatgtgtacgaactaacgaagaatttgatccagttgatga  
tgggtcccgacgatgagacagatttagcaaaactctcgaagacgttgtacaatatgaacaagaaatagaatcgttagaagcaacttatca  
tataatcatagttggcgttaacaattatgggcgtcatatttttaactcctgttatagtttagttgttctgtgacaaaaataatgaccaatataa  
gttccataaattgctaccgtaa

116 kDa DNA polymerase (E9L) ORF 80 (59787-56767) +++ 4

ttatgcttcgtaaaatgtaggtttgaaccaaaccattcttcaaagaatgagatgcataaaactttattatccaatagattgactatttcggacg  
tcaatcggtttaaagtaaacttcgtaaaatattcttggatcactgccgagtttaaaacttctatcgataattgtctcatatgttttaattttacaagt  
tttgggcatggtacattagccggacaaatatatgcaaaataatcgttctccaagttctatagtttctggattattttattatattcagtaac  
caaatacatattagggttatctgcggaattataatttgagtgatgcattcgactcaacataaataattctagaggagacgatctactatcaaat  
tcggatcgtaaatctgtttctaaagaacggagaataatctatacacctgattagaattcatccgtccttcagacaacatctcagacagtctg  
gtcttgtatgtcttaatcatattcttatgaaacttggaaacatctcttctagtttcactagtagcttttattattctctcaggtacagattttgaatt  
gacgatgctgagttttcatcgttgtatattcttcttctgattgcataatcagattcttatataccgcctcaaaactctattttaaaattattaaaca  
tactctattattaatcagtcgttctaaactcttctgctatttctatagacttatcgacatcttgactgtctatctctgtaaacacggagtcggtatct  
catacacgctacgaaaacgaaatctgtaatctataggcaacgatgtttcacatcggattaatatctctatcgtccatataaaatggattac  
ttaatggattggcaaacgtaacataccggttagataactctgctccatttagtaccgattctagatacaagatcattctacgtcctatggatgt  
gcaactcttagccgaagcgtatgagtatagagcactatttctaaatcccacagaccatatactgagttggctactatctgtacgtatattg  
catggaatcatagatggccttttcagttgaaactggtagcctgttttaacatcttttatatctggctctctctgccaaaaatgttcttaatagtct  
ggaatggcttctctatcgatctatcgaaaattgctatttcagagatgaggttcggtagtctaggttcacaatgaaccgtaatatatctagga  
ggtaggataattctgaagcaatagctgattatttattcttctccaatctattggtagtaacaacgacaccgactaatgttccggagatagatt  
ccaaagatacacacattaggatacagactgttataatcaagattaatacattattactaaacatttttgttttggagcaaataccctaccgc  
cttcataaggaaacttttgtttgtttctgatctaactaagatagtttagttccaacaatagctttaacagtggaaccttgatgactgtactcg  
ctctatattcgaataccatggattgaggaagcacatatgttgacgcacccgcgtctgttttgttctactccataatactcccacaaactg  
acacaaacaagcatcatgaatacagtatctagccatatctaaagctatgttagattataatccttatacatctgagctaaatcaacgtcatc  
cttccgaaaagataatttatatgtatcattaggtaaagtaggacataatagtagcactttaaatccattttccaaatatcttacgaattacttt  
catataatcctcatcaacagtcacataattacctgtgggttaaaccttgcgaatgcagcggccttgccttctgcgtctgtagtatcgtcac  
cgataaacgtctttcttaactcctctatttaatactttaccatgcaactgaacgcgttcttggatatagaatccaattgttacgaatccaat  
tttcagatttttgatgaatgaatatagatcgaaaaatagttccattattgttattaacgtgaaacgtagtattggccatgccgcctactccc  
ttatgactagactgatttctctcataaatacagagatgtacagcttcttttgtccggagatctaagataatcttctctctgttaataactct  
agacgattagtaatatatctcagatcaaagttatgtccgttaaaggaacgacgtagtcgaacgttagttccaacaattgttagctattcgt  
acaaaactatttcagaacatagaactagttctcgttcgtaatccatttccattagtgactgtatcctcaaacatcctctatcgacggcttctgt  
atttctgttccgttaacatctcttcaatagagcgtaaacaataatcgtttaccacttaaatcgatataacagtaactgtatcgagattgg  
gttaataaatacagaaggaaacttctatcgaagtacactctatatctagaaataagtagatcttgggatatcgaatctaggtatttttta  
gcgaacagttacgttggatcgtcacaatgataacatccattgttaactttgtcaaatattgctcgtccaacgagtaacatccgtctggaga  
tatcccgtagaataataaaaccaactaattgagaaattcatccatgggtggcattttgtatgctgcgttcttggctcttctatcaaccaca  
atctgcgacggagcatttctatcttaatatctagattataacttattgtctcgtcaatgtctatagttctcatcttcccaacggccctgcatta  
aatggaggaggagacaatgactgatataattcgtccgtcactacgtaataaaagtaatgaggaaatcgataaatacgggtctcaccatttc  
gacatctggatttcagatataaaaatctgtttcaccgtgactttcaaccaattaatgcaccgaacatccat

65 kDa envelope protein (F12L)

ORF 60 (43919-42012)

+++ 2

ttataatTTTaccatctgactcatggattcattaatatctttataagagctactaacgtataattctttataactgaactgagatatatacaccgg  
tctatggTTTccataattgagtaaatgaatgctcggcaataactaatggcaaatgtatagaacaacgaaattatactagagttgttaaagtta  
atattttctatgagctgttccaataaattatttgtgtgactgcgttcaagtcataatcatcttgatactatccagtaaaccgtttttaagttctg  
aatattattateccattgtaaagcccctaattcgactatcgaatatcctgctctgatagcagtttcaatatcgacggacgtcaatactgtaata  
aagggtgtagtatgtcatcatcgtgataaactactggaatatggcgttagtaggtacggtaactttacacaacgcgatataaactttcctt  
ttgtaccatttttaacgtagttgggacgtcctgcaggggtattgtttgaagaaatgatatcgagaacagatttgatacgaattttgttggattc  
tgattatttactataatataatctagacagatagatgattcgataaatagagaaggatatatcgttggtaggataatacatccccattccagtat  
ctcggatactctattaatgacactagttaagaacatgtcttctattctagaaaacgaaaacatcctacatggactcattaaaacttctaacgct  
cctgattgtgtctcgaatgccctcgtacaaggatttcaaggatgccatagatttctttgaccaacgatttagaattgcgttagcatctgattttt  
attaaatcgaatggcggctctcgtgttgcctaccccaatgataacaatagtctgttaaagataaaccgcaagaaaatttatacgcacccat  
ccaaataaccctagcaccatcggatgatattaatgtattattatagattttccatccacaattattgggccagtatactgttagcaacgggtata  
tcgaatagattactcatgtaacctactagaatgatagttcgtgtactagtacataatctttaatccaatctaagaaattttaaaattagattttta  
cactgttaaagttaacaaaggtattaccgggtacgtggatcatatattggtattggtccattatcagtaaatagctccataaactgatacgg  
cgatgggttttatatgtgttgatctaacgaggaagaaattcgacccacaattcatctctagatatgtatttaatatcaaacggtaacacatc  
aatttcgggacgcgtatatgtttctaaatttttaatccaaatataatgatgacctatatgccctattatcatactgtcaactatagtagacctaga  
gaacttacgatacatctgtttcctataatcgttaaattttacaaatctataacatgctaaaccttttgacgacaaccattcattaatttctgatatg  
gaatctgtattctcgataccgtattgttctaaagccagtgtctatatctccctgttcgtgggaacgctttcgataatatcgatcaacgggataat  
ctgaagttttggagaataatgatgactcatgatctatttcgtccataaacaatctagacataggaattggaggcgatgatcttaattttgtgca  
atgagtcgtcaatcctataacttctaattcttgaatatctcatcatcgacataatactatctatgttatcatcgtatattagtagtataccatgaccttctt  
catttcgtgccaaaatgatatacagtcctaaatagttacgcaatatctcaatagtttcataattgttagctgtttcatcaagatttgtaccctgtt  
aacat

62 kDa rifampicin resistance gene (D13L)

ORF 145 (113026-111371)

+++

1

ttagttattatctcccataatcttggaatacttacccttgatcgtaagataccttatacagggtcattacatacaactaccaattgtttgtaca  
aatagattggatggttgacatccatggtggaataaactactcgaacagatagtttatctttcccctagatacatitggccgtaatagttgtcg  
gcctaaagaatatctttggtgtaaagttaaaagttagggttcttgttccattattgcttttgcagtagttcattataaattctcgagatgggtc  
gttctctgaatatagaacatcatttccaaatctaacttctagtctagaataatatacggtcttattcttaaaatctattcccttgatgaagggtc  
gtaatagaacaaatccttggccttgaattcggtgatctattatctccgttatagacgttacgttgactagtcctaaagacttacaggaatagat  
gtatcgatgatgttgatactatgtgatgtgagcaaagattgttctctagtggcatcactatatgttccagtaatggcggaaaacttttag  
aatgttatataaaaagaatttttctgtgttccaaacattagcagattagatgaagataaacactcatattatcaggaacattatcaattttac  
atacacatcagcatcttgaatagaaacgataccatcttctggaacctctacgatctcggcagactccggataaccagtcggtgggcatc  
actaacaataactagatcatccaacaatctactcacataatgcattatataatcttttcatcttgtgagtaccttgatacgaataaatttatt  
atccgtatttccataataagggttagtataaacagagagcgatgttgcgcgatgaacttcagttacagtcgccgttgggtgtttatttgacct  
attactctcctaggttctctataaacgatggttaatttgtacattcttaacctatataccaataaagctcaattcaggaacataaacaattct  
tgttgacgtttcaaagtcgaacgaagagtcacgaataacgatacggatactggattgaaggttaccgttacggttaattttgaatcggt  
agttaagactgctgaatgtatcttccacatcaaacggagtttaataataaacgtatactgtagatggttcttaatagtgtcattaggagtag  
gccaatagaaatatcattaagttcactagaatatccagagtgttcaaagcaattgtattattgatacaattattatataattcttcgcctcaat  
ttccaaataacaccgttacgaagagatagatacgtgattaatacatttatccaacatatggtacgtaaccgaatcttccatacctt  
aactctggaagttccaaactcagaaccaaataattaagcgcagtaataatactgatccctaatttcgaagctagcgatagcctgattgtctg  
gaccatcgttgcataactccggatagagaaatatattgcggcatatataaagttggaatttgactatcgactgcgaagacattagaccgt  
ttaatagagtcatccccaccgatcaaagaattaatgatagtattattcat

32 kDa carbonic anhydrase-like protein (D8L)      ORF 137 (107120-106206)      +++      1

ctagttttgttttctcgcaatatcgtcgactcataagaagagaatagcggtaagtataaacacgaatactatggcaataattgcgaatgt  
ttattcccttcgatataattttgataatatgaaaaacatgtctctctcaaatcggacaaccatctcataaaatagttctcgcgctggagag  
gtagttgctgctgtataatctcccagaataatataacttgcgtgtcgtcgttcaatttatacggatttctatagttctgttatataacggt  
ttccatcatgattagacgacgacaatagtttctaaatttagatagttgatcagaatgaatgtttattggcgttggaaaaattatccatacagc  
gtctgcagagtgttgatagttgttcttagatatgtaaaataatccaacgtactaggtagcaaatgtctagataaaaatactgaatcaaacg  
gcgcagacgtattagcggatctaattggaatccaattgattgactatcttttgaaaatatacattttatgatccgatacttgaagaatataga  
aataatgataagtcctcatcgtgttttttgcctcttcataagaactataatttttctattccaatgaacaagattaatctctccagagtattgt  
cacatctatcaagtattggatccataatcgtcttcccttcccaatatatatgtagtgtatgataacacatattcattggggagaaacctcca  
cttatatactctctttaaataatcttactagtttccagtgttctggatagtggttgggttcgactcattataatgtatgtctaacgggttca  
tcgcgcgttagaaattgcttttttagttctatattaataggagatagttgttgcggcat

36 kDa late protein (IIL)      ORF 87 (63935-62997)      +++      1

ttattcagcattacttgatatagtaatttaggcacagtcacaaactcaaccactctcgatacattaactctctcattttctttaacaaattctgc  
atatcttcgtaaaaagattcttgaaactttttagaataatctatcgactctagatgaaatagcgttcgtcaacatactatgtttgtatacataaag  
gcgccattttaacagtttctagtacaaaaatgctagcgatcctaggatcctttagaatcacatagattgacgattcgtctcttagtaactc  
tagtaaaataatcatacaatctagtacgcgaaataatattatccttgacttgaggagatctaaacaatctagttttagaacaatcgataagttc  
atcggaatgacatacatactatctttaatagaactctttcatccagttgaatggattcgtccttaaccaactgattaatgagatcttctatttt  
atcattttccagatgatatgtatgtccattaaagttaaattgtgtagcgttcttttagtctagcagccaatactttaacatcactaatatcgat  
tacaaggagatgatttatctatggtattaagaattcgttttcgacatccgtcaaaaccaattccttttgcctgtatcatccagttttccatcc  
ttgtaagaaattattttctactagactattaataagactgataaggattcctccataattgcacaatccaaactttttcacaaactagacttta  
cgagatctacaggaatgcgtacttcaggtttcttagcttgtgatttttcttttgcggacattttctgtgaccaactcatctaccatttcattgat  
ttagcagtgaaataagctttcaatgcacgggcactgatactattgaaaacgagttgatcttcaaattccgccat

16 kDa protein (TC14L)

ORF10 (10995-10567)

+++

1

Ttaattgcaaagatctatataatcattatagcgttgacttatggactctggaatcttagacgatgtacagtcactataatcatggcatattta  
tacattgttttatagcatagtagttatctacgatgttagatatttctctcaatgaatcaatcacataatctaattgtaggtttatgacataatagcat  
ttcagcagttcaatgtttctagattcgttgatggcaatggctatacatgtataccgttatttgatctaattgtgacatctgaaccggattctag  
agtaaagatactagagattgtttattatctaacagccttgtgaagaagtgtttctcctcgttgtcaatcatgttaattgtctttaagataaggt  
aggcaaatgtttatagtactaagaattgggcaagcataagacat

38 kDa serine protease inhibitor 2 (B13R)

ORF 421 (172562-172912)

++

4

Atggatatcttcagggaaatcgcatcttctatgaaaggagagaatgtattcatttctccagcgtcaatctcgtcagtttgacaatactgtat  
tatggagctaattggatccactgctgaacagctatcaaaatgtagaaaaggaggagaacatggataaggtagcgtcaaaatatctc  
attcaaatccataaataaagtatatggcgatattctgccgtgtttaagattccttttgagaaaaattggcgataagttcaaactgttgact  
tcactgattgtcgactatagatgcaatcaacaagtgtgtagatatctttactgaggggaaaaatcaatccactattggatgaaccattgtctc  
ctgatacctgtctcctagcaattagtccgtatactttaagcaaaatgggtgacgccattcgaaaaggaatttaccagtgttatccctttta  
cgtatctccgacggaaatggtagatgtaagtatgatgtctatgtacggcaaggcatttaacacgcactctgtaaaggaatcattcggcaac  
ttttcaatcatagaactgccatattgttgagatactagtatgatggtcattcttcagacaagattgatggattagaatccatagaacaaaat  
ctaacagatacaaaatttaagaaatgggtgaactctctggaagctacgtttatcgatgttcacattcccaagtttaaggttaacaggctcgtat  
aatctgggtgatactctagtaaagtcaggactgacagaggtgttcggttcaactggagattatagcaatatgtgtaattcagatgtgagtg  
cgacgctatgatccacaaaacgtatatagatgtcaatgaagagtatacagaagcagctgcagcaactgtgcactgggtgcagactgtg  
catcaacaattacaaatgagttctgtgtagatcatccgttcatctatgtgattaggcatgttgatggaaaaattctttcgttggtagatattgc  
ctccgacaactaattgttaa

18 kDa protein (C7L)

ORF 24 (19257-18805)

++

3

Ttaatccatggactcataatctctatacgggattaacggatgttctatatacggggatgagtagttcttctttaactttatacttttactaat  
atatttagactgatgtatgggtaatagtgtttgaagagctcgttctcatcatcagaataaatcaatatctctgtttttgttatacagatgtatta  
cagcctcatatattacgtaatagaacgtgtcatctaccttattaactttcaccgcatagttgttgcaaatcgggttaactcctttgacctcgtc  
atttccgaccaatctgggcgtataatgaatctaaactttaatttcttgtaatcattcgaataaatttttagttgcatccgtagttatccccttat  
taactgtaaatttctcaacgcgataatctccattaataatgatgtcgaattcgtgtgtatcccat

## 24.6 kDa protein (B2R)

ORF 226 (163876-164535) ++ 2

Atggcgaatgttttacgcacacgctctcggtgggtacgacgagaatcttcatgccttctggaatatcatcgactgttgccaatgatgtcaggaaatattctgtgtgtcagttataataacaagtatgacattgtaaaagacaaataiatgtgggtttacagtcaggtgaacaagagatata ttggagcactgctgcctatgtttgagtgcaatgaatatctacaaattggagatccgatccatgatcaagaaggaaatcaaattctctatcatc acatatcgccacaaaaactactatgctctaagcggaatcggtacgagagtctagacttgtgtttggaaggagtagggattcatcatcac gtacttgaaacaggaaacgctgtatatggaaaagttcaacatgattattctactatcaaagagaaggccaaagaaatgagtacacttagtc caggacctataattgattaccacgtctggataggagattgtatctgtcaagttactgctgtggacgtacatggaaaggaaattatgagaat gagattcaaaaagggtgcggtgcttccgatcccaatctggtaaaagttaaacttggggagaatgatacagaaaatcttcttctactatat cggcggcaccatcgaggtaa

## 36 kDa protein (A11R)

ORF 164 (124976-125932) ++ 1

atgacgaccgtaccagtacggatatacaaaacgatttaattacagagtttcagaagataattatccatctaacaaaaattatgaaataac tcttcgtcaaatgtctattctaactcacgttaacaacgtgtagatagagaacataatgccgccgtagtgtcatctccagaggaaatattcct cacaacttaataagatctatttccagatgatgattctccggccactattatcgaaagagtacaacctcactactattattgacgatactcc acctcctacgtttcgtagagagttattgatatcggaacaacgtcaacaacgagaaaaagatttaattacagtatcgaaaaatgctgaa gcaataatggaatctagatctatgatatcttctatgccaacacaaacaccatccttgggagtagttatgataaagataaaagaattcagat gttggaggatgaagtggtaacttagaaatcaacgatctaatacaaaatcatctgataaatttagataaatttaccagaataactatttggttaag actccgtataaatcaacagaagttaataagcgtatagccatcgtaattatgcaaattgaacgggtctcccttatcagtcgaggacttggga tgtttgttcagaggatgaaatagatagaatctataaaacgattaacaatatacagaaagtagaaaacgaaaaattatcgctactaacgtg attattattgtcataaacattatcgagcaagcattgctaaaactcggatttgaagaaatcaaaggactgagtaccgatataccttcagaaatt atcgatgtggagatcgagatgactgcgatgctgtagcatctaaactaggaatcggtaacagtcgggttcttaattattgtattgtttatactc aagatattcgttaaacgaattaaaattatttaa

## 15 kDa membrane phosphoprotein (A14L)

ORF 167 (126785-127128) ++ 1

Ttagttcatggaaatatcgctatgattggatgaatgactccgctaactctgtgggggtgcgcagtgctttccccacatagaataaattagca ttccgactgtgataataataccaagtataaacgccataaactcaatactttccatgtacgagtgggactggtagacttactaaagtcataa aaggcgaagatacacgaaagaatcaaaagaatgattccagcgattagcacgccggaaaaataaattccaatcataagcatcatgtccat

## 147 kDa protein (J6R)

ORF 117 (86510-90370) ++ 1



atggctgtaatctctaagggtacgtatagtctatatgatcaaaagagattaatgctacagatattatcattagtcagtgttaaaatgacgacg  
atatcggtaccgttaaagatggtagactaggtgctatggatggggcattatgtaagacttggtggaaaacggaattggaatgttcgggtca  
ctggggtaaagtaagtattataaaactcatatagtttaagcctgaatttttcagaaattattcgttactgaatcatatagtattcactgagg  
attattgcgttcacgagaaccgtattccgacgatattaacctaaagagttatcgggacacgctcttaggagattaaaggataaaatattat  
ccaagaaaaagtcagtgttggaacagcgaatgtatgcaaccgtatcaaaaaattacttttcaaagaaaaagggtttgttcgtcaacaagttg  
gatgatattaacgttcctaattctctcatctatcaaaagtttaattctattcatgaaaagttttggccattattagaaattcatcaatatccagcta  
acttattttatacagactactttcccatccctccgctgattattagaccggctattagttttggatagatagtatacccaaagagaccaatga  
attaacttacttattaggtatgatcgtaagaattgtaacttgaatgctgatgaacagggtatccagaaggcggtaatagaatacgtatgatatt  
aaaattatttctaataacacttccagtatcaatttatcatatattacatccggcaaaaataatattgattagaagttatattgtcgcccgacgaaa  
agatcagaccgctagatctgtaattgggtccagtcacatctatcaccgttaatgaggttaggaatgccgcataattagaaatacacttaca  
gaaaagatatttgtaatgcctttacagtggataaagttaaacaactattagcgtcaaaccaagttaaattttactttaataaacgattaaacc  
aattaacaagaatacgccaaggaaagttattaaaaataaaaatacattattgcctgggtgattgggtagaagtagctgttcaagaatataca  
agtattatttttgggaagacagccgtctctacatagatacaacgtcatcgcttcatctatcagagctaccgaaggagatactatcaaaatatct  
cccggaaattgccaactctcaaaatgctgatttcgacggagatgaagaatggatgatattggagcaaaatcctaaagccgtaattgaacaa  
agtattcttatgatccgacgacgttactcaaacacgatattcatggagccccgtttatggatctattcaagatgaatcgtagcagcgtat  
tcattgtttagaatacaagatctttgtttagatgaagtattgaacatcttggggaaatatggaagaaagttcgatcctaaaggtaaattgaaat  
tcagcggtaaaagatatctatacttacttgataggtgaaaagattaattatccgggtctctaaaggatggtgaaattattgcaaacgacgta  
gatagtaattttgttggtctatgaggcatctgtcattggctggacttctatccgatcataagtcgaacgtggaaggtatcaactttattatca  
agtcattcttatgttttaagagatatctatctatttacggttttgggggtgacattcaaaagatctgagaccaaattcgacgttactaataaattg  
gaggccatcaacgtgaaaaaataagaacttatcaagaagcatacgccaatatctcaacgatgaagagacgggaaaaatagttccatt  
atctaaagccttagaggcggactatgtggaatccatgttatccaacttgacaaatcttaatatccgagagatagaagaacatatgagacaa  
acgctgatagatgatccagataataacctcctgaaaaatggccaaagcgggtataaagtaaatcccacagaactaatgtatattctaggtat  
cttatggacaacagaggattgatggtgaaccagcagagactcgagtattgggtagagtccttacttactatcttccagactctaaggatcc  
agaaggaagagggttatattcttaattctttaaaaaaggattaacagggttctcaattacttttcgatgctggttgcagatctaatctactg  
atatcgctctgtgaaacatcacgtaccggaacactggctagaaaaatcattaaaaagatggaggatattggtggtcgacggatacggaca  
agtagttataggttaatacgcctcatcaagtacgccccaattataccaaaattctagggtcagtagttaaaccgttagatcttatctatccaga  
tgagtccatgacttggtatttggaaattagtgtctgtggaataaaataaaacagggattcgttactctcagaaacagaaacttgcaaaaa  
agacattggcgccgtttaatttccctagatttcgtcaaacccaccactgaggataatgctattaagggttaaggatctgtacgatattgattcata  
acgtcattgatgatgtgagagagaaatacttctttacggtatctaataatagattttatggagtatatattcttgacgcatttaaccttctagaa  
ttagaattacaaaagaaacggctatcactatctttgaaaagttctatgaaaaactcaattatactctaggtggtggaactcctattggaattat  
ttctgcacaggtattgtctgagaagtttacacaacaagccctgtccagttttcacactactgaaaaaagtggtgccgtcaacaaaaaactt  
ggtttcaacgagtttaataacctgactaatttgagtaagaataagaccgaaattatcactctggtatccgatgatattcttaaaacttcaatctg  
ttaagattaatttgaatttgatgtttgggagaattaaatccaaacatcactcttcgaaaagaaacagatagggtatgtagtagatataatagt  
caatagattatacatcaagagagcagaaattaccgaattagtcgtcgaatatatgattgaacgatttatctcctttagcgtcattgtaaagga  
atgggggtatggagacattcattgaggacgaggataatattagatttactgtctacctaaatttcgttgaaccggaagaattgaatcttagtaa  
gtttatgatggttcttccgggtgccgccaacaagggaagattagtaaatcaagattcctatcttgactatacgggatatgacgacttca  
atcaacaaaaaagctcaataagatgactgtgaactcatgaatctaaaagaattgggttctttcgatttggaaaacgtcaacgtgtatcct  
ggagtatggaatacatacgatattctcggtatcgaggccgctcgtgaatacttgtgcgaagccatgttaaacacctatggagaagggttc  
gattatctgtatcagccttgtgatcttctcgtagtttactatgtgctagtacgaaccagaatcagtgaataaattcaagttcggcgagcta  
gtactcttaagagagctacgttcggagacaataaagcattgttaaacgcggctcttcataaaaagtcagaacctattaacgataatagtag  
ctgccacttttttagcaagggtccctaataataggaactggatattacaaatactttatcgacttgggtcttctcatgagaatggaaggaaact  
atctgataagatatcttctcaaaagatcaaggaaatggaagaacagaagacttttaa

77 kDa protein (O1L))

ORF 84 (62477-60477)

++ 1

ttaacgagttccatttataatcatccaatattattgaaatgacgttgatggacagatgatacaataagaaggtacggtacctttgtccaccat  
ctcctccaattcatgctctattttgtcattaactttaatgtatgaaaacagtacgccacatgcttccatgacagtggtgaacactttggatacaa  
aatgtttgacattagataattgtttaagactgtcaatctataatagatagtagctataatatattctatgatggtattgaagaagatgacaatct  
tggcatattgatcatttaacacagacatggtatcaacagatagcttgaatgaaagagaatcagtaattggaataagcgtcttctcgatgga  
gtgtccgtataccaacatgctgatatttggatgtattccattaaattattagtttttcttttattctcgtaaacagcatttctgtcaacggacc  
ccaacatcgttgaccgattaagttttgattgattttccgtgtaaggcgtatctagtcagatcgatagcctatccaataatccatcatctgtgc  
gtagatcacatcgtagacttttaattctctatagaagagcgacagacatctggaacaattacagacagcaatttctttattctctacagatgt  
aagatacttgaagacattcctatgatgatgcagaattttggataaacacggatttgatggtatctgttaccataattccttggatggctgatagt  
gtcagagcacaagatttccaatctttgacaatttttagcaccattatctttgttttgatatctatatcagacagcatggtgcgtctgacaacaca  
gggattaagacggaaagatgaaatgattctctcaacatcttcaatggataccttgctatttttctggcattatctatatgtgcgagaatatcc  
ctagagaatcagtatccttttgatgatagtggtatcgaatgacatgggacgtctaaaccttcttattctatcaccagattgcatgggtgattgt  
cttcttcttttatcataatgtaattctctaaattcatcggcaaattgtctatatctaaaatcataatatgagatgtttacctctacaatatctgttc  
tccaatgttagagtatctacatcagttttgtattccaaattaaacatggcaacggatttaattttatattcctctattaaagtcctcgtagataata  
cagaatgtagataatcatttaattccatcgtagatggttgaagatgcttgttgacaaaatctttaattgtcttgatgaagggtgggactatatct  
aacatcttgattaataaaaatttataacatgtccataggatactttgtaactagttttatacacatctctcatcggttaagtttagacagaatatc  
tgaacaggtggtatattatattcatcagatatacgaagaacaatgtccaaatctatattgtttaatatattatagatgtagtgtagctcctac  
aggaatatctttaactaagtcaatgatttcatcaaccgttagatctattttaagttaatcatataggcattgatttttaaagggtatgtagcctt  
actacattctcattaattaaccattccaagtcactgtgtgaagaagattatattctatcataagcttgactacatttgggtcccataaccattaa  
gaattcttatgatataaggaaacagcttttaggtactcatctactctacaagaattttggagagccttaacgatatcagtgacgtttattatttc  
aggaggaaaaaacctaaccattgagaatgtcggaggttaatagcttcagatacagtgattttggcaatagtcggtgtaatccataatccagt  
aacacgagctggtgcttgtagacacctttcaatgtttaatttttgaataaagctttgataaagccttcctcgcaaattccggatacatga  
cat

59 kDa protein (C2L)

ORF30 (24156-22618)

+ 4

ctattgtagaaattgttttcacagttgctcaaaaacgatggcagtgacttatgagttacgttacactttggagtcctcatcttagtaaacatat  
ataatattcgatattacgagttgacatatcgaacaaftccaagtatttgatttggataaatattcgatctgtataattaagatataa  
caccgcaagaacacacgaacatcttctacatggttaaagtacatgtacaattctatccatttgccttctaactatatatttgtagataat  
tacgagtcctgtgagtaattccagtaattacatagatgtcgcgctgtactctacagcataaactatactatgatgtctaggcatgggagac  
tttttatccaacgatttttagtgaaacattccacatcggttaatactacatatctttcatacgtggataaaactccaccattacatatatcatc  
gtttacgaataccgacgcgcctgaatatctaggagtaattaagtttggagtccttaccatttcgaagtgccgtgttcaaatattctgccac  
acccgttgaaatagaaaattctaactctcctattacatataactttccatcgtaaacacaagtactaacttctgattttaacgacgacatattag  
taaccgttttcatttttcgtttcaagatctacccgcgatacggataaacaatgtctattgttaatcatgccccaataatgtatagacaatta  
gtaaaacatttgcattatagaattgtctatctgtattaccgactatcgccaatattctgtcctaggagagtaatgggttatttggtatatataa  
cagagtttttaagactactatattatgttttataaccatttcgtgtcactggcctttagatttggatatagttaatcccaacaatgatatagcatt  
cgcatagtattagtcataaacttgggatgtaaaatgttgatgatatctacatcgtttggattttatgtatccactttaataatcatagctgta  
catcctcatgatttacgttaacgtcttcgtgggataagatagttgtcagttcatcctttagataatttccaaattctggatcggatgtcaccgca  
gtaatattgttgattatttctgacatcgacgcattatatagtttttaattccatatcttttagaaaagttaaacatccttatacaatttgtggaatt  
atattatgaatcatagttttacacatagatctactacaggcggaacatcaattattacggcagcaactagtatcatttctacattgtttatggt  
gatgtttatcttctccagcgcatatagttctaatagcgattcaaacgcgtgatagtttataaccattcaatataatcgcttcatcctttagatggt  
atcctgaatgcgtttaaaaaaattatacggagacgccgtaataattccttattcacttgtataatttccccattgatagaaaatatcacgcttt  
ccat

90 kDa protein (D5R)

ORF132 (101420-103777)

+ 1

atggatgctgctattagaggaatgatgttatcttctgcttaagactataggtgtcccatcagcatgtagacaaaatgaagatccaagatt  
cgtagaagcatttaaatgcgacgagttaaaaagatatattgataaataccagaatgtacactattcgaaagcttagggatgaggaagca  
tactctatagtcagaattttcatggatgtagatttagacgcgtgtctagacgaaatagattatttaacggctattcaagattttattatcgagggt  
gtcaaaactgtgtagctagattcgcgtttacagaatgcgggtgccattcatgaaaatgtaataaaatccatgagatctaatttttcattgactaa  
tctacaaatagagataaaaacaagttttcatattatcttttagacacgtataccactatggatacattgatagctatgaaacgaacactattag  
aattaagtagatcatctgaaaatccactaacaagatcgatagacactgccgtatataggagaaaaacaactcttcgggtgttaggtactag  
gaaaaatccaaattgcgacactattcatgtaatgcaaccaccgcatgataatatagaagattacctattcacttactggtgatatgaacaaca  
atagttattacttttctctacaacgacgattggaggatttagtttctgataagttatgggaaccagggtttatttcattcgaagacgctataaa  
agagtttcaaaaatattcattaattctataataaactttaatgatctcgatgaaaaataattttacaacgggtaccactgggtcatagattacgtaac  
accttgtgcattatgtaaaaaacgatcgataaacatccgcatcaactatcggtggaaaatgggtctattagaatttacaaaactggtaatc  
cacatagttgtaaagttaaaattgttccgttggatggtaataaactgtttaattgcacaaagaatttttagacactaactctgttttattaacc  
aacgaggagactatagtttggattaataattcatggaaatttaacagcgaagaacccttgataacaaaactaattctgtcaataagacat  
caactacctaaggaatattcaagcgaattactctgtccgaggaaacgaaagactgtagaagctaacatacgagacatgttagtagattca  
gtagagaccgatacctatccggataaacttccgtttaaaaatgggtgtattggacctggtagacggaatgtttactctggagatgatgctaa  
aaaatatacgtgtactgtatcaaccggatttaaatgtgacgatacaaaagttcgtcgaagacagtccagaaatggaagagttaatgaatatac  
attaacgatataccaaccattaacggatgaaaataagaaaaatagagagctatatgaaaaaacattatctagtgtttatgtgggtctaccaa  
aggatgtttaacattctttttggagaaaactgcaactggaaagtcgacaaccaaactgtttgtaaagtctgctatcggtgacctgtttgtga  
gacgggtcaacaattttaacagatgtattggataaaggacctaatccattatcgtaacatgcatttgaaaagatctgtattctgtagcga  
actacctgattttgcctgtagtggatcaagaaaattagatctgataatataaaaagttgacagaacctgtgtcattggaagaccgtgttt  
ctccaataaaattaataatagaaccatgctacaatcattatcgataactaattacaaacctgtctttgataggatagataacgcattaatgag  
aagaattgccgtcgtgcgattcagaacacacttttctcaaccttctggtagagaggctgctgaaaataatgacgcgtacgataaagtgaa  
actattagacgaggggttagatggtaaaaatacaaaaataatagatatagattgcatttctatacttgttggtgaaatggtacaaaaaataatca  
gttctctattatgaaactatactacacccgaagagattcctgactttgcatttctatctcaaaaataggtactctgttagtatctagctctgtaa  
gcatattccattaatgacggacctctccaaaaaggatataattgtacgataatgtggttactcttccgttgactactttccaacagaaaata  
tccaagtattttaattctagactatttggacacgatataagagagcttcatcaatagacataagaaatttgccaatgttagtgatgaatatctgc  
aatatatattcatagaggatatttcatctccgtaa

23 kDa protein (A17L)

ORF170 (129314-128703)

+ 1

ttaataatcgtcagttattaaactgttaaatgttggatatcaacatctacattttcccgcagtataagggttgttcaggtatactgttcagg  
aatggttacatttatacttcttctatagtcctgtctttcgatgttcacacatatgcaagaacagaataaaacaaaataatgtaagaataat  
aaatatctgtgaattcgtaatacattgattgccataataattacagcagctacaatacacacaatagacattcccacagtgttgccattacc  
tccacgatacatttgagtactaagcaataggttaataactaagctagtaagaggcaatagaaaagatgagataaatatcatcaatatagag  
attagaggagggttatatagagccaagacgaacaaaatcaaacggagtaacgttctaacatcattattttgaagattcccaaaataatcatt  
cattcctcataatcgtttgcatacctccatctttaggcataaacgattgctgctgttctctgtaaataaatctttatcaagcactccag  
acccgcagagaagtcgtcaagcatattgtaatatcttaataactcat

## SEQUENZPROTOKOLL

<110> Ugur Sahin, Özlem Türeci, Burkhard Ludewig

5 <120> Verfahren zur Identifizierung biologisch aktiver  
Strukturen mikrobieller Erreger

<130> 268-3 PCT

0 <150> DE 10108626.1  
<151> 2001-02-22

<160> 22

5 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 32

<212> DNA

0 <213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Adaptor-N(6)-Oligonukleotide

5

<400> 1

gatgtaatac gaattggact catatannnn nn

32

0 <210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

5 <220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
EcoRI-Adaptor-Oligonukleotide

<400> 2

0 gatgtaatac gaattcgact catat

25

<210> 3

<211> 24

5 <212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
MfeI-Adaptor-Oligonukleotide

0

<400> 3

gatgtaatac aattggactc atat

24

5

<210> 4

<211> 846

<212> DNA

<213> Vaccinia virus

0

<400> 4

```

5  ttacttttgg aatcgttcaa aacctttgac tagttgtaga atttgatcta ttgccctacg 60
   cgtatactcc cttgcatcat atacgttcgt caccagatcg tttgtttcgg cctgaagttg 120
   gtgcatactt ttttcaacac tcgacatgag atccttaagg gccatatcgt ctgatttttg 180
   ttgagatgct gctcctggat ttggattttg ttgtgctggt gtacatactg taccaccagt 240
   aggtgtagga gtacatacag tggccacaat aggagggtga ggagggtgtaa ccgttgaggat 300
   agtacaagaa atatttccat ccgattgttg tgtacatgta gttgttggtgta acgtctgaga 360
   aggttggtga gatggcggcg tcgtcgtttt ttgatcttta ttaaatttag agataatatc 420
   ctgaacagca ttgctcggcg tcaacgctgg aaggagtga ctcgccggcg catcagtatc 480
   ttcagacagc caatcaaaaa gattagacat atcagatgat gtattagttt gttgtcgtgg 540
10  ttttggtgta ggagcagtac tactaggtag aagaatagga gccggtgtag ctggttgaac 600
   cggctgtgga gttatatgaa tagttggttg tagcgggttg ataggctgtc tgctggcggc 660
   catcatatta tctctagcta gttgttctcg caactgtctt tgataatacg actcttgaga 720
   ctttagtcct atttcaatcg cttcatcctt tttcgtatcc ggatcctttt cttcagaata 780
   atagattgac gactttggtg tagaggattc tgccagcccc tgtgagaact tgtaaagaa 840
15  gtccat 846

```

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 2178

20 &lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Vaccinia virus

&lt;400&gt; 5

```

25  ctaagacgtc gcatctctct ctgtttcggc attggtttca ttattacgtc tacagtcggt 60
   caactgtctt tcaagatctg atattctaga ttggagtctg ctaatctctg tagcattttc 120
   acggcattca ctcagttgtc tttcaagatc tgagatttta gattggagtc tgctaattctc 180
   tgtaagattt cctcctccgc tctcgatgca gtcgggtcaac ttattctcta gttctctaata 240
   acgcgaacgc agtgcacaa cttcttgcgt gtcttctctg ttgctgtac attcatcgag 300
   tctagattcg agatctctaa cgcgtcgtcg ttcttctca agttctctgc gtactacaga 360
30  aagcgtgtcc ctatcttggt gatatttagc aatttctgat tctagagtac tgattttgct 420
   tacgtagtta ctaatatattg tcttggcctt atcaagatcc tccttgtatt tgtcgcattc 480
   cttgatatac ctacgaagtc tggacagttc ccattcgaca ttacgacggt tatcgatttc 540
   agctcggaga tcgtcatcgc gttgttttag ccacatacga ctgagttcaa gttctcgttg 600
   acaagatcca tctacttttc cattcctaata agtatccagt tccttttcta gttctgaacg 660
35  catttctcgt tccctatcaa gcgattctct caattctcgg atagtcttct tatcaatttc 720
   taataaatct gaaccatcat ctgtcccatt ttgaatatcc ctgtgttctt tgatctcttt 780
   tgtaagtcgg tcgattcttt cggttttata aacagaatcc ctttccaaag tcctaattct 840
   actgagttta tcaactaagt ctgcattcaa ttcggtgagt tttctcttgg cttcttccaa 900
   ctctgtttta aactctccac tatttccgca ttcttctcgt catttatcta accattcaat 960
40  tagtttatta ataactagtt ggtaatcagc gattcctata gccgttcttg taattgtggg 1020
   aacataatta ggatcttcta atggattgta tggcttgata gcatcatctt tatcattatt 1080
   aggggggatg acaaccttaa ttggttggtc ctcattctct ccagtagcgt gtggttcttc 1140
   aataccagtg ttagtaatat gcttaggcaa atgcttgctg tacgcgggca cttcctcatc 1200
   catcaagtat ttataatcgg gttctacttc agaatatctt tttctaagag acgcgacttc 1260
45  gggagtttag agaagaactc tgtttctgta tctatcaacg ctggaatcaa tactcaagtt 1320
   aaggatagcg aatacctcat cgtcatcatc cgtatcttct gaaacaccat catatgacat 1380
   ttcataagat ctaacgtatt gataaataga atcagattta gtattaaaca gatccttaac 1440
   ctttttagta aacgcataat tatatttttag atctccagat ttcataatat gatcacatgc 1500
   cttaaatgtc agtgcttcca tgatataatc tggaacacta atgggtgatg aaaaagatac 1560
50  cggaccatat gctacgttga taaataactc tgaaccacta agtagataat gattaatggt 1620
   aaggaagagg aaatattcag tatataggta tgtcttggcg tcatatcttg tactaaacac 1680
   gctaaacagt ttgttaaatg gatcaatttc caatagatta attagagcag caggaatacc 1740
   aacaaacata ttaccacatc cgtattttct atgaatatca catatcatgt taaaaaatct 1800
   tgatagaaga gcgaatatct cgtctgactc aatgagtcgt agttcagcag caacataagt 1860
55  cataactgta aatagaacat actttcctgt agtattgatt ctgactccg catcaacacc 1920
   attattaaaa atagttttat atacatcttt aatctgctct ccgttaatcg tcgaacgttc 1980
   tagtatacgg aaacactttg atttcttctc tgtagttaat gacttagtga tatcacgaag 2040
   aatattacga attacatttc ttgtttttct tgagagacat gattcagaac tcaactcatc 2100
   gttccatagt ttttctacct cagtggcgaa atctttggag tgcttggtac atttttcaat 2160
60  aaggttcgtg acctccat 2178

```

<210> 6  
<211> 954  
<212> DNA  
5 <213> Vaccinia virus

<400> 6  
atgaaaacga tttccggtgt tacgttggtta tgcgtactac ctgctgttgt ttattcaaca 60  
tgtactgtac ccactatgaa taacgctaaa ttaacgtcta ccgaaacatc gtttaataat 120  
10 aaccagaaag ttacgtttac atgtgatcag ggatatacatt cttcggatcc aaatgctgtc 180  
tgcgaaacag ataaatggaa atacgaaaat ccatgcaaaa aaatgtgcac agtttctgat 240  
tacatctctg aactatataa taaaccgcta tacgaagtga attccaccat gacactaagt 300  
tgcaacggcg aaacaaaata ttttcggtgc gaagaaaaaa atggaaatac ttcttggaat 360  
gatactgtta cgtgtcctaa tgcggaatgt caacctcttc aattagaaca cggatcgtgt 420  
15 caaccagtta aagaaaaata ctcatctggg gaatatatga ctatcaactg tgatgttgga 480  
tatgaggtta ttggtgcttc gtacataagt tgtacagcta attcttgga tgttattcca 540  
tcatgtcaac aaaaatgtga tataccgtct ctatctaattg gattaatttc cggatctaca 600  
ttttctatcg gtggcggtat acatcttagt tgtaaaagtg gttttatact aacgggatct 660  
ccatcatcca catgtatcga cggtaaatgg aatcccgtac tcccaatatg tgtacgaact 720  
20 aacgaagaat ttgatccagt ggatgatggg cccgacgatg agacagattt gagcaaaact 780  
tcgaaagacg ttgtacaata tgaacaagaa atagaatcgt tagaagcaac ttatcatata 840  
atcatagtgg cgtaacaat tatgggcgtc atatttttaa tctccgttat agtattagtt 900  
tgttcctgtg acaaaaataa tgaccaatat aagttccata aattgctacc gtaa 954

25 <210> 7  
<211> 3021  
<212> DNA  
30 <213> Vaccinia virus

<400> 7  
ttatgcttcg taaaatgtag gttttgaacc aaacattctt tcaaagaatg agatgcataa 60  
aactttatta tccaatagat tgactatttc ggacgtcaat cgttttaaagt aaacttcgta 120  
35 aaatattctt tgatcactgc cgagttttaa aacttctatcg ataattgtct catatgtttt 180  
aatatttaca agttttttgg tccatggtag attagccgga caaatatatg caaaaataa 240  
tcggttccca agttctatag tttctggatt atttttatta tattcagtaa ccaatacat 300  
attagggtta tctgcggatt tataatttga gtgatgcatt cgactcaaca taaataatc 360  
tagaggagac gatctactat caaattcggg tctgtaaatct gtttctaag aacggagaat 420  
atctatacat acctgattag aattcatccg tccctcagac aacatctcag acagtctggg 480  
40 cttgtatgtc ttaatcatat tcttatgaaa cttggaaaca tctcttctag tttcactagt 540  
acctttatta attctctcag gtacagattt tgaattcgac gatgctgagt atttcatcgt 600  
tgtatatttc ttcttcgatt gcataatcag attcttatat accgcctcaa actctatttt 660  
aaaattatta aacaatactc tattattaat cagtcgttct aactcttctg ctatttctat 720  
agacttatcg acatcttgac tgtctatctc tgtaaacacg gagtccggtat ctccatacac 780  
45 gctacgaaaa cgaaatctgt aatctatagg caacgatgtt ttcacaatcg gattaatatc 840  
tctatcgccc atataaaatg gattacttaa tggattggca aaccgtaaca taccgttaga 900  
taactctgct ccatttagta ccgattctag atacaagatc attctacgtc ctatggatgt 960  
gcaactctta gccgaagcgt atgagtatag agcactattt ctaaatccca tcagaccata 1020  
tactgagttg gctactatct tgtacgtata ttgcatggaa tcatagatgg ctttttcagt 1080  
50 tgaactggta gcctgtttta acatcttttt atatctggct ctctctgcca aaaatgttct 1140  
taatagtcta ggaatggttc cttctatcga tctatcgaaa attgctattt cagagatgag 1200  
gttcggtagt ctaggttcac aatgaaccgt aatatatcta ggaggtggat atttctgaag 1260  
caatagctga ttattttatt cttcttccaa tctattggta ctaacaacga caccgactaa 1320  
55 tgtttccgga gatagatttc caaagataca cacattagga tacagactgt tataatcaaa 1380  
gattaataca ttattactaa acatttttgg ttttgagca aataccttac cgccttcata 1440  
aggaaacttt tgttttgttt ctgatctaac taagatagtt ttagtttcca acaatagctt 1500  
taacagtgga cccttgatga ctgtactcgc tctatattcg aataccatgg attgaggaag 1560  
cacatagtgt gacgcacccg cgtctgtttt tgtttctact ccataatact cccacaaata 1620  
ctgacacaaa caagcatcat gaatacagta tctagccata tctaaagcta tgttttagatt 1680  
60 ataactctta tacatctgag ctaaataaac gtcaccttt ccgaaagata atttatatgt 1740  
atcattaggt aaagtaggac ataatagtag gactttaaat ccattttccc aaatatcttt 1800

```

5  acgaattact ttacatataa taccctcatc aacagtcaca taattacctg tgggttaaaac 1860
   ctttgcaaat gcagcggctt tgcctttcgc gtctgtagta tcgtcaccca taaacgtcat 1920
   ttctctaact cctctattta atactttacc catgcaactg aacgcgttct tggatataga 1980
   atccaatttg tacgaatcca atttttcaga tttttgaatg aatgaatata gatcgaaaaa 2040
10 tatagttcca ttattgttat taacgtgaaa cgtagtattg gccatgcgcg ctactccctt 2100
   atgactagac tgattttctc cataaataca gagatgtaca gcttcctttt tgtccggaga 2160
   tctaaagata atcttctctc ctgttaataa ctctagacga ttagtaatat atctcagatc 2220
   aaagttatgt ccgttaaagg taacgacgta gtcgaacggt agttccaaca attgttttagc 2280
   tattcgtaac aaaactatct cagaacatag aactagttct cgttcgtaat ccattttccat 2340
15 tagtgactgt atcctcaaac atcctctatc gacggcttct tgtatttcct gttccgttaa 2400
   catctcttca ttaatgagcg taaacaataa tcgtttacca cttaaatacga tataacagta 2460
   acttgatgc gagattgggt taataaatac agaaggaaac ttcttatcga agtgacactc 2520
   tatatctaga aataagtagc atcttgggat atcgaatcta ggtatttttt tagcgaaaca 2580
   gttacgtgga tcgtcaccaat gataacatcc attgttaatc tttgtcaaat attgctcgtc 2640
15 caacgagtaa catccgtctg gagatatccc gttagaaata taaaaccaac taatattgag 2700
   aaattcatcc atgggtggcat tttgtatgct gcgtttcttt ggctcttcta tcaaccacat 2760
   atctgcgacg gagcattttc tatctttaat atctagatta taacttattg tctcgtcaat 2820
   gtctatagtt ctcatctttc ccaacggcct cgcatataat ggaggaggag acaatgactg 2880
   atatatctcg tccgtcacta cgtataaaaa gtaatgagga aatcgtataa atacggtctc 2940
20 accatttcga catctggatt tcagatataa aaatctgttt tcaccgtgac tttcaaacca 3000
   attaatgcac cgaacatcca t                                     3021

```

&lt;210&gt; 8

25 &lt;211&gt; 1908

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Vaccinia virus

&lt;400&gt; 8

```

30 ttataatttt accatctgac tcatggattc attaatatct ttataagagc tactaacgta 60
   taattcttta taactgaact gagatatata caccggatct atgggtttcca taattgagta 120
   aatgaatgct cggcaataac taatggcaaa tgtatagaac aacgaaatta tactagagtt 180
   gttaaagtta atattttcta tgagctgttc caataaatta tttgttgatga ctgcgttcaa 240
35 gtcataaata atcttgatag tatccagtaa accgttttta agttctggaa tattattatc 300
   ccattgtaaa gcccttaatt cgactatcga atatcctgct ctgatagcag tttcaatatc 360
   gacggacgct aatactgtaa taaaggtggt agtatgtca tcatcgtgat aaactactgg 420
   aatatggtcg ttagatggtc cgttaacttt acacaacgcg atatataact ttctttttgt 480
   accattttta acgtagttgg gacgtcctgc agggatttgt tttgaagaaa tgatatcgag 540
   aacagatttg atacgatatt tgttggtatc ctgattattt actataatat aatctagaca 600
40 gatagatgat tcgataaata gagaaggat atcggttggt ggataatata tccccattcc 660
   agtattctcg gatactctat taatgacact agttaagaac atgtcttcta ttctagaaaa 720
   cgaaaacatc ctacatggac tcattaaaac ttctaacgct cctgatttgt tctcgaatgc 780
   ctctgacaag gatttcaagg atgccataga ttctttgacc aacgatttag aattgcgttt 840
   agcatctgat ttttttatta aatcgaatgg tcggctctct gggttgctac cccaatgata 900
45 acaatagtct tgtaaagata aaccgcaaga aaatttatac gcatccatcc aaataaccct 960
   agcaccatcg gatgatatta atgtattatt atagattttc catccacaat tattgggcca 1020
   gtatactggt agcaacggta tatcgaatag attactcatg taacctacta gaatgatagt 1080
   tcgtgtacta gtcataatat cttaaatcca atctaagaaa tttaaaatta gattttttac 1140
   actgttaaag ttaacaaagg tattaccggg gtacgtggat atcatatatg gtattggtcc 1200
50 attatcagta atagctccat aaactgatac ggcgatgggt tttatatgtg tttgatctaa 1260
   cgaggaagaa attcgcaccc acaattcatc tctagatatg tatttaatat caaacggtaa 1320
   cacatcaatt tcgggacgcg tatatgtttc taaattttta atccaaatat aatgatgacc 1380
   tatatgccct attatcatat tgtcaactat agtacaccta gagaacttac gatacatctg 1440
55 tttcctataa tcgttaaatt ttacaaatct ataactgct aaaccttttg acgacaacca 1500
   ttcattaatt tctgatattg aatctgtatt ctcgataccg tattgttcta aagccagtgc 1560
   tataatctcc tgttcgtggg aacgctttcg tataatatcg atcaacggat aatctgaagt 1620
   ttttgagaaa taatatgact catgatctat ttcgtccata aacaatctag acataggaat 1680
   tggaggcgat gatcttaatt ttgtgcaatg agtcgtcaat cctataactt ctaatcttgt 1740
   aatattcatc atcgacataa tactatctat gttatcatcg tatattagta taccatgacc 1800
60 ttcttcattt cgtgccaata tgatatacag tcttaaatag ttacgcaata tctcaatagt 1860
   ttcataattg ttagctgttt tcatcaagat ttgtaccctg tttaacat 1908

```



<210> 9  
<211> 1656  
<212> DNA  
<213> Vaccinia virus

<400> 9

10	ttagttatta	tctcccataa	tcttggtaat	acttaccctt	tgatcgtaag	ataccttata	60
	caggtcatta	catacaacta	ccaattgttt	ttgtacataa	tagattggat	ggttgacatc	120
	catggtggaa	taaaactactc	gaacagatag	tttatctttc	cccctagata	cattggccgt	180
	aatagtgtgc	ggcctaaaga	atatctttgg	tgtaaagtta	aaagttaggg	ttcttgttcc	240
	attattgctt	tttgtcagta	gttcattata	aattctcgag	atgggtccgt	tctctgaata	300
	tagaacatca	tttccaaatc	taacttctag	tctagaaata	atatcggtct	tattcttaaa	360
15	atctattccc	ttgatgaagg	gatcgttaat	gaacaaatcc	ttggcctttg	attcggtga	420
	tctattatct	ccgttataga	cgttacgttg	actagtccaa	agacttacag	gaatagatgt	480
	atcgatgatg	ttgatactat	gtgatatgtg	agcaaagatt	gttctcttag	tggtcatcact	540
	atatgtttcca	gtaatggcgg	aaaacttttt	agaaatgtta	tatataaaag	aattttttcg	600
	tggtccaaac	attagcagat	tagtatgaag	ataaacactc	atattatcag	gaacattatc	660
20	aattttttaca	tacacatcag	catcttgaat	agaaacgata	ccatcttctg	gaacctctac	720
	gatctcggca	gactccggat	aaccagtcgg	tgggccatca	ctaacaataa	ctagatcatc	780
	caacaatcta	ctcacatatg	catctatata	atctttttca	tcttgtgagt	accctggata	840
	cgaaataaat	ttattatccg	tatttccata	ataaggttta	gtataaacag	agagcgatgt	900
	tgccgcatga	acttcagtta	cagtcgccgt	tggttggttt	atttgacctt	ttactctcct	960
25	aggtttctct	ataaacgatg	gtttaatttg	tacattctta	accatatatc	caataaagct	1020
	caattcagga	acataaacia	attctttgtt	gaacgtttca	aagtcgaacg	aagagtcacg	1080
	aataacgata	tcggatactg	gattgaaggt	taccgttacg	gtaatttttg	aatcggatag	1140
	tttaagactg	ctgaatgtat	cttccacatc	aaacggagtt	ttaatatata	cgtatactgt	1200
	agatggttct	ttaatagtgt	cattaggagt	taggccaata	gaaatatcat	taagttcact	1260
30	agaatatcca	gagtgtttca	aagcaattgt	attattgata	caattattat	ataattcttc	1320
	gccctcaatt	tcccaaataa	caccgttaca	cgaagagata	gatacgtgat	taatacattt	1380
	atatccaaca	tatggtacgt	aaccgaatct	tcccatacct	ttaacttctg	gaagttccaa	1440
	actcagaacc	aaatgattaa	gcgcagtaat	atactgatcc	ctaatttcga	agctagcgat	1500
	agcctgattg	tctggaccat	cgtttgtcat	aactccggat	agagaaatat	attgcggcgt	1560
35	atataaagtt	ggaatttgac	tatcgactgc	gaagacatta	gaccgtttaa	tagagtcacg	1620
	cccaccgatc	aaagaattaa	tgatagtatt	attcat			1656

<210> 10  
<211> 915  
<212> DNA  
<213> Vaccinia virus

<400> 10

45	ctagttttgt	ttttctcgcg	aatatcgctg	actcataaga	aagagaatag	cggttaagtat	60
	aaacacgaat	actatggcaa	taattgcgaa	tgttttattc	ccttcgatat	atttttgata	120
	atatgaaaaa	catgtctctc	tcaaatcgga	caaccatctc	ataaaatagt	tctcgcgcg	180
	tggagaggta	gttgctgctc	gtataatctc	cccagaataa	tatacttgcg	tgctcgctgt	240
	caattttatac	ggattttctat	agttctctgt	tatataatac	ggttttccat	catgattaga	300
50	cgacgacaat	agtgttctaa	atttagatag	ttgatcagaa	tgaatgttta	ttggcggttg	360
	aaaaattatc	catacagcgt	ctgcagagtg	cttgatagtt	gttcttagat	atgtaaaata	420
	atccaacgta	ctaggtagca	aattgtctag	ataaaatact	gaatcaaacg	gcgcagacgt	480
	attagcggat	ctaattggaat	ccaattgatt	gactatcttt	tgaaaatata	catttttatg	540
	atccgatact	tgtaagaata	tagaaataat	gataagtcga	tcacgtgtgt	tttttgcttc	600
55	ttcataagaa	ctatatTTTT	tcttattcca	atgaacaaga	ttaatctctc	cagagtattt	660
	gtacacatct	atcaagtgat	tggatccata	atcgtcttcc	tttccccaat	atatatgtag	720
	tgatgataac	acatattcat	tggggagaaa	ccctccactt	atatatcctc	ctttaaaatt	780
	aatccttact	agttttccag	tgttctggat	agtggttggt	ttcgactcat	tataatgtat	840
	gtctaacggc	ttcaatcgcg	cgttagaat	tgctttttta	gtttctatat	taataggaga	900
60	tagttgttgc	ggcat					915

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 939

&lt;212&gt; DNA

5 &lt;213&gt; Vaccinia virus

&lt;400&gt; 11

	ttattcagca	ttacttgata	tagtaatatt	aggcacagtc	aaacattcaa	ccactctcga	60
	tacattaact	ctctcatttt	ctttaacaaa	ttctgcaata	tcttcgtaaa	aagattcttg	120
10	aaacttttta	gaatatctat	cgactctaga	tgaaatagcg	ttcgtcaaca	tactatgttt	180
	tgtatacata	aaggcgccca	ttttaacagt	ttctagtgc	aaaatgctag	cgatccctagg	240
	atccttttaga	atcacataga	ttgacgattc	gtctctctta	gtaactctag	taaaaataatc	300
	atacaatcta	gtacgcgaaa	taatattatc	cttgacttga	ggagatctaa	acaatctagt	360
	tttgagaaca	tcgataagtt	catcggaat	gacatacata	ctatctttaa	tagaactctt	420
15	ttcatccagt	tgaatggatt	cgctcttaac	caactgatta	atgagatctt	ctattttatc	480
	attttccaga	tgatatgtat	gtccattaaa	gttaaattgt	gtagcgcttc	tttttagtct	540
	agcagccaat	actttaacat	cactaatatc	gatatacaaa	ggagatgatt	tatctatggg	600
	attaagaatt	cgtttttcga	catccgtcaa	aaccaattcc	tttttgcttg	tatcatccag	660
	ttttccatcc	tttgtaaaga	aattattttc	tactagacta	ttaataagac	tgataaggat	720
20	tcctccataa	ttgcacaatc	caaacttttt	cacaaaacta	gactttacga	gatctacagg	780
	aatgcgtact	tcaggtttct	tagcttggtg	ttttttcttt	tgcgacatt	ttcttggtgac	840
	caactcatct	accatttcat	tgatttttagc	agtgaaataa	gctttcaatg	cacgggcact	900
	gatactattg	aaaacgagtt	gatcttcaaa	ttccgccat			939

25

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 429

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Vaccinia virus

30

&lt;400&gt; 12

	ttaattgcaa	agatctatat	aatcattata	gcgttgactt	atggactctg	gaatcttaga	60
	cgatgtacag	tcatctataa	tcatggcata	tttaatacat	tgttttatag	catagtagtt	120
	atctacgatg	ttagatattt	ctctcaatga	atcaatcaca	taatctaattg	taggtttatg	180
35	acataatagc	attttcagca	gttcaatggt	tctagattcg	ttgatggcaa	tggtataaca	240
	tgtatatccg	ttatttgatc	taatgttgac	atctgaaccg	gattctagca	gtaaagatac	300
	tagagattgt	ttatttatatc	taacagcctt	gtgaagaagt	gtttctcctc	gtttgtcaat	360
	catgttaatg	tctttaagat	aaggtaggca	aatgtttata	gtactaagaa	ttgggcaagc	420
	ataagacat						429

40

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 1038

&lt;212&gt; DNA

45 &lt;213&gt; Vaccinia virus

&lt;400&gt; 13

	atggatatct	tcagggaat	cgcatcttct	atgaaaggag	agaatgtatt	catttctcca	60
	gcgtcaatct	cgtcagtatt	gacaatactg	tattatggag	ctaattggatc	cactgctgaa	120
50	cagctatcaa	aatatgtaga	aaaggaggag	aacatggata	aggtagcgc	tcaaaatatac	180
	tcattcaaat	ccataaataa	agtatatggg	cgatattctg	ccgtgtttta	agattccttt	240
	ttgagaaaaa	ttggcgataa	gtttcaaact	gttgacttca	ctgattgtcg	cactatagat	300
	gcaatcaaca	agtgtgtaga	tatctttact	gaggggaaaa	tcaatccact	attggatgaa	360
	ccattgtctc	ctgatacctg	tctcctagca	attagtgcog	tatactttaa	agcaaaatgg	420
55	ttgacgccat	tcgaaaagga	atttaccagt	gattatccct	tttacgtatc	tccgacggaa	480
	atggtagatg	taagtatgat	gtctatgtac	ggcaaggcat	ttaatcacgc	atctgtaaag	540
	gaatcattcg	gcaacttttc	aatcatagaa	ctgccatatg	ttggagatac	tagtatgatg	600
	gtcattcttc	cagacaagat	tgatggatta	gaatccatag	aacaaaatct	aacagatatac	660
	aatttttaaga	aatggtgtaa	ctctctggaa	gctacgttta	tcgatgttca	cattcccaag	720
60	tttaaggtaa	caggctcgtg	taatctgggtg	gatactctag	taaagtcagg	actgacagag	780
	gtgttcggtt	caactggaga	ttatagcaat	atgtgtaatt	cagatgtgag	tgtcgacgct	840

atgatccaca aaacgtatat agatgtcaat gaagagtata cagaagcagc tgcagcaact 900  
 tgtgcactgg tgtcagactg tgcatacaaca attacaaatg agttctgtgt agatcatccg 960  
 ttcattctatg tgattaggca tgttgatgga aaaattcttt tcgttggtag atattgctct 1020  
 ccgacaacta attgttaa 1038  
 5  
 <210> 14  
 <211> 453  
 <212> DNA  
 10 <213> Vaccinia virus  
 <400> 14  
 ttaatccatg gactcataat ctctatacgg gattaacgga tgttctatat acgggggatga 60  
 gtagttctct tctttaactt tatacttttt actaatcata tttagactga tgtatgggta 120  
 15 atagtgtttg aagagctcgt tctcatcatc agaataaatc aatatctctg tttttttgtt 180  
 atacagatgt attacagcct catatattac gtaatagaac gtgtcatcta ctttattaac 240  
 tttcaccgca tagttgtttg caaatacggg taatcctttg acctcgctga tttccgacca 300  
 atctgggcgt ataatagaac taaactttta tttcttgtaa tcattcgaaa taatttttag 360  
 tttgcatccg tagttatccc ctttatgtaa ctgtaaattt ctcaacgcga tatctccatt 420  
 20 aataatgatg tcgaattcgt gctgtatacc cat 453  
 <210> 15  
 <211> 660  
 25 <212> DNA  
 <213> Vaccinia virus  
 <400> 15  
 atggcgatgt tttacgcaca cgtctcgggt gggtagcagc agaatcttca tgcctttcct 60  
 30 ggaatatcat cgactgttgc caatgatgtc aggaatatatt ctgttgtgtc agtttataat 120  
 aacaagtatg acattgtaaa agacaaatat atgtggtgtt acagtcaggt gaacaagaga 180  
 tatattggag cactgctgcc tatgtttgag tgcaatgaat atctacaaat tggagatccg 240  
 atccatgatc aagaaggaaa tcaaatctct atcatcacat atcgccacaa aaactactat 300  
 gctctaagcg gaatcgggta cgagagtcta gacttgtgtt tggaaggagt agggattcat 360  
 35 catcacgtac ttgaacacag aaacgctgta tatggaaaag ttcaacatga ttattctact 420  
 atcaaagaga aggccaaaga aatgagtaca cttagtccag gacctataat tgattaccac 480  
 gtctggatag gagattgtat ctgtcaagtt actgctgtgg acgtacatgg aaaggaaatt 540  
 atgagaatga gattcaaaaa ggggtgcggtg cttccgatcc caaatctggt aaaagttaaa 600  
 cttggggaga atgatacaga aaatctttct tctactatat cggcggcacc atcgaggtaa 660  
 40  
 <210> 16  
 <211> 957  
 <212> DNA  
 45 <213> Vaccinia virus  
 <400> 16  
 atgacgaccg taccagtgc gatatataca aacgatttaa ttacagagtt ttcagaagat 60  
 aattatccat ctaacaaaaa ttatgaaata actcttcgtc aaatgtctat tctaactcac 120  
 50 gttaacaacg tggtagatag agaacataat gccgccgtag tgtcatctcc agaggaaata 180  
 tcctcacaac ttaatagaaga tctattttcca gatgatgatt ctccggccac tattatcgaa 240  
 agagtacaac ctcatactac tattattgac gatactccac ctccacgtt tcgtagagag 300  
 ttattgatat cggaacaacg tcaacaacga gaaaaaagat ttaattattac agtatcgaaa 360  
 aatgctgaag caataatgga atctagatct atgatatctt ctatgccaac acaaacacca 420  
 55 tccttgggag tagtttatga taaagataaa agaattcaga tgttggagga tgaagtgggt 480  
 aatcttagaa atcaacgatc taatacaaaa tcatctgata atttagataa ttttaccaga 540  
 atactatttg gtaagactcc gtataaatca acagaagtta ataagcgtat agccatcggt 600  
 aattatgcaa atttgaacgg gtctccctta tcagtcgagg acttgatgtt ttgttcagag 660  
 gatgaaatag atagaatcta taaaacgatt aaacaatatc acgaaagtag aaaacgaaaa 720  
 60 attatcgtca ctaacgtgat tattattgtc ataaacatta tcgagcaagc attgctaaaa 780  
 ctccgatttg aagaaatcaa aggactgagt accgatatca cttcagaaat tatcgatgtg 840

gagatcggag atgactgcga tgctgtagca tctaaactag gaatcggtaa cagtcgggtt 900  
cttaatatgt tattgtttat actcaagata ttcgttaaac gaattaaaaat tatttaa 957

5 <210> 17  
<211> 273  
<212> DNA  
<213> Vaccinia virus

10 <400> 17  
ttagttcatg gaaatatcgc tatgattggt atgaatgact ccgctaactc tgtgggggtgc 60  
gcagtgcctt cccacatag aataaattag cattccgact gtgataataa taccaagtc 120  
aaacgccata atactcaata ctttccatgt acgagtggga ctggtagact tactaaagtc 180  
aataaaggcg aagatacacg aaagaatcaa aagaatgatt ccagcgatta gcacgccgga 240  
15 aaaataattt ccaatcataa gcatcatgtc cat 273

<210> 18  
<211> 3861  
20 <212> DNA  
<213> Vaccinia virus

<400> 18  
25 atggctgtaa tctctaagggt tacgtatagt ctatatgac aaaaagagat taatgctaca 60  
gatattatca ttagtcatgt taaaaatgac gacgatatcg gtaccgttaa agatggtaga 120  
ctagggtgcta tggatggggc attatgtaag acttgtggga aaacggaatt ggaatgtttc 180  
ggctactggg gtaaagtaag tatttataaa actcatatag ttaagcctga atttatttca 240  
gaaattattc gtttactgaa tcatatatgt attcactgag gattattgag ttcacgagaa 300  
ccgtattccg acgatattaa cctaaaagag ttatcgggac acgctcttag gagattaaag 360  
30 gataaaatat tatccaagaa aaagtcatgt tggaaacgag aatgtatgca accgtatcaa 420  
aaaattactt tttcaaagaa aaagggttgt ttcgtcaaca agttggatga tattaacgtt 480  
cctaattctc tcatctatca aaagttaatt tctattcatg aaaagttttg gccattatta 540  
gaaattcatc aatatccagc taacttattt tatacagact actttcccat cctccgctg 600  
attattagac cggctattag tttttggata gatagtatac ccaaagagac caatgaatta 660  
35 acttacttat taggtatgat cgtaagaat tgtaacttga atgctgatga acaggttatc 720  
cagaaggcgg taatagaata cgatgatatt aaaattattt ctaataacac ttccagtatc 780  
aatttatcat atattacatc cggcaaaaaa aatatgatta gaagtatat tgcgcccga 840  
cgaaaagatc agaccgctag atctgttaatt ggtcccagta catctatcac cgtaaatgag 900  
gtaggaatgc ccgcatatat tagaaataca cttacagaaa agatatttgt taatgccttt 960  
40 acagtggata aagttaaaca actattagcg tcaaaccaag ttaaatttta ctttaataaa 1020  
cgattaaacc aattaacaag aatacgccaa ggaaagttaa ttaaaaataa aatacattta 1080  
ttgcctggtg attgggtaga agtagctgtt caagaatata caagtattat ttttggaga 1140  
cagccgtctc tacatagata caacgtcatc gcttcatcta tcagagctac cgaaggagat 1200  
actatcaaaa tatctcccgg aattgccaac tctcaaaatg ctgatttcga cggagatgaa 1260  
45 gaatggatga tattggagca aaatcctaaa gccgtaattg aacaaagtat tcttatgtat 1320  
ccgacgacgt tactcaaaca cgatattcat ggagcccccg tttatggatc tattcaagat 1380  
gaaatcgtag cagcgtattc attgtttaga atacaagatc tttgtttaga tgaagtattg 1440  
aacatcttgg ggaaatatgg aagaaagttc gatcctaaag gtaaatgtaa attcagcgg 1500  
aaagatatct atacttactt gataggtgaa aagattaatt atccgggtct cttaaaggat 1560  
50 ggtgaaatta ttgcaaacga cgtagatagt aattttgttg tggctatgag gcatctgtca 1620  
ttggctggac tcttatccga tcataagtgc aacgtggaag gtatcaactt tattatcaag 1680  
tcatcttatg tttttaagag atatctatct atttacggtt ttgggggtgac attcaaagat 1740  
ctgagaccaa attcgacgtt cactaataaa ttggaggcca tcaacgtaga aaaaatagaa 1800  
cttatcaaaag aagcatacgc caaatatctc aacgatgtaa gagacgggaa aatagttcca 1860  
55 ttatctaagg ctttagagc ggactatgtg gaatccatgt tatccaactt gacaaatcct 1920  
aatatccgag agatagaaga acatatgaga caaacgctga tagatgatcc agataataac 1980  
ctcctgaaaa tggccaaagc ggggtataaa gtaaatccca cagaactaat gtatattcta 2040  
ggtacttatg gacaacagag gattgatggt gaaccagcag agactcgagt attgggtaga 2100  
gtcttacctt actatcttcc agactctaag gatccagaag gaagagggta tattcttaat 2160  
60 tctttaacaa aaggattaac aggttctcaa tattactttt cgatgctggg tgccagatct 2220  
caatctactg atatcgtctg tgaaacatca cgtaccggaa cactggctag aaaaatcatt 2280

	aaaaagatgg	aggatatggg	ggcgcacgga	tacggacaag	tagttatagg	taatacgcctc	2340
	atcaagtacg	ccgccaatta	taccaaatt	ctaggctcag	tatgtaaacc	tgtagatctt	2400
	atctatccag	atgagtccat	gacttggtat	ttggaaatta	gtgctctgtg	gaataaaata	2460
	aaacagggat	tcgtttactc	tcagaaacag	aaacttgcaa	aaaagacatt	ggcgccgttt	2520
5	aatttcctag	tattcgtcaa	accaccact	gaggataatg	ctattaaggt	taaggatctg	2580
	tacgatatga	ttcataacgt	cattgatgat	gtgagagaga	aatacttctt	tacggtatct	2640
	aatatagatt	ttatggagta	tatattcttg	acgcattctta	atccttctag	aattagaatt	2700
	acaaaagaaa	cggctatcac	tatctttgaa	aagttctatg	aaaaactcaa	ttatactcta	2760
	ggtggtggaa	ctcctattgg	aattatttct	gcacaggtat	tgtctgagaa	gtttacacaa	2820
10	caagccctgt	ccagttttca	cactactgaa	aaaagtgggtg	ccgtcaaaca	aaaacttggg	2880
	ttcaacgagt	ttataaacct	gactaatttg	agtaagaata	agaccgaaat	tatcactctg	2940
	gtatccgatg	atatctctaa	acttcaatct	gttaagatta	atttcgaatt	tgtatgtttg	3000
	ggagaattaa	atccaaacat	cactcttcga	aaagaaacag	ataggtatgt	agtagatata	3060
	atagtcaata	gattatacat	caagagagca	gaaattaccg	aattagtcgt	cgaatatatg	3120
15	attgaacgat	ttatctcctt	tagcgtcatt	gtaaaggaat	ggggtatgga	gacattcatt	3180
	gaggacgagg	ataatattag	atttactgtc	tacctaaatt	tcggtgaacc	ggaagaattg	3240
	aatcttagta	agtttatgat	ggttcttccg	ggtgccgcca	acaagggcaa	gattagtaaa	3300
	ttcaagattc	ctatctctga	ctatacggga	tatgacgact	tcaatcaaac	aaaaaagctc	3360
	aataagatga	ctgtagaact	catgaattcta	aaagaattgg	gttctttcga	tttggaaaac	3420
20	gtcaacgtgt	atcctggagt	atggaataca	tacgatatct	tcggtatcga	ggccgctcgt	3480
	gaatacttgt	gcgaagccat	gttaaaccac	tatggagaag	ggttcgatta	tctgtatcag	3540
	ccttgtgatc	ttctcgctag	tttactatgt	gctagttacg	aaccagaatc	agtgaataaa	3600
	ttcaagttcg	gcgcagctag	tactcttaag	agagctacgt	tcggagacaa	taaagcattg	3660
	ttaaacgcgg	ctcttcataa	aaagtcagaa	cctattaacg	ataatagtag	ctgccacttt	3720
25	tttagcaagg	tcctaataat	aggaactgga	tattacaaat	actttatcga	cttgggtctt	3780
	ctcatgagaa	tggaaaggaa	actatctgat	aagatatctt	ctcaaaaagat	caaggaaatg	3840
	gaagaaacag	aagactttta	a				3861
30	<210> 19						
	<211> 2001						
	<212> DNA						
	<213> Vaccinia virus						
35	<400> 19						
	ttaacgagtt	ccattttatat	catccaatat	tattgaaatg	acgttgatgg	acagatgata	60
	caaataagaa	ggtacggtac	ctttgtccac	catctcctcc	aattcatgct	ctattttgtc	120
	attaacttta	atgtatgaaa	acagtacgcc	acatgcttcc	atgacagtgt	gtaacacttt	180
	ggatacaaaa	tgtttgacat	tagtataatt	gtttaagact	gtcaatctat	aatagatagt	240
40	agctataata	tattctatga	tggtagtgaa	gaagatgaca	atcttggcat	attgatcatt	300
	taacacagac	atggtatcaa	cagatagcct	gaatgaaaga	gaatcagtaa	ttggaataag	360
	cgtcttctcg	atggagtgtc	cgtataccaa	catgtctgat	attttgatgt	attccattaa	420
	attatttgat	tttttctttt	tattctcgtt	aaacagcatt	tctgtcaacg	gacccaaca	480
	tcggttgaccg	attaagtttt	gattgatttt	tccgtgtaag	gcgtatctag	tcagatcgta	540
45	tagcctatcc	aataatccat	catctgtgcg	tagatcacat	cgtacacttt	ttaatctctt	600
	atagaagagc	gacagacatc	tggacaatt	acagacagca	atttctttat	tctctacaga	660
	tgtgaagatac	ttgaagacat	tcctatgatg	atgcagaatt	ttggataaca	cggtattgat	720
	ggtatctggt	accataattc	ctttgatggc	tgatagtgtc	agagcacaag	atttccaatc	780
	tttgacaatt	tttagcacca	ttatctttgt	tttgatatct	atatcagaca	gcatgggtgcg	840
50	tctgacaaca	cagggattaa	gacggaaaga	tgaatgatt	ctctcaacat	cttcaatgga	900
	taccttgcta	tttttctctg	cattatctat	atgtgcgaga	atatcctcta	gagaatcagt	960
	atcctttttg	atgtagtggt	atctcaatga	catgggacgt	ctaaaccttc	ttattctatc	1020
	accagattgc	atgggtgatt	gtcttctttc	ttttatcata	atgtaatctc	taaattctac	1080
	ggcaaattgt	ctatatctaa	aatcataata	tgagatgttt	acctctacaa	atatctgttc	1140
55	gtccaatggt	agagtatcta	catcagtttt	gtattccaaa	ttaaacatgg	caacggattt	1200
	aatttttatat	tcctctatta	agtcctcgtc	gataataaca	gaatgtagat	aatcatttaa	1260
	tccatcgtag	atgggttgaa	gatgcttggt	gacaaaatct	ttaatgtgtc	tgatgaaggt	1320
	gggactatat	ctaacatctt	gattaataaaa	atttataaca	ttgtccatag	gatactttgt	1380
	aactagtttt	atacacatct	cttcatcggt	aagtttagac	agaatatcgt	gaacaggtgg	1440
60	tatatttatat	tcacagata	tacgaagaac	aatgtccaaa	tctatattgt	ttaatatatt	1500
	atatagatgt	agtgtagctc	ctacaggaat	atctttaact	aagtcaatga	tttcatcaac	1560

5 cgttagatct attttaaggt taatcatata ggcattgatt tttaaaaggt atgtagcctt 1620  
 gactacattc tcattaatta accattccaa gtcactgtgt gtaagaagat tatattctat 1680  
 cataagcttg actacatttg gtcccgatag cattaaagaa ttcttatgat ataaggaaac 1740  
 agcttttagg tactcatcta ctctacaaga attttggaga gccttaacga tatcagtgac 1800  
 5 gtttattatt tcaggaggaa aaaacctaac attgagaatg tcggagttaa tagcttccag 1860  
 atacagtgat tttggcaata gtccgtgtaa tccataatcc agtaacacga gctggtgctt 1920  
 gctagacacc ttttcaatgt ttaatttttt tgaaataagc tttgataaag ccttcctcgc 1980  
 aaattccgga tacatgaaca t 2001

10 <210> 20  
 <211> 1539  
 <212> DNA  
 <213> Vaccinia virus

15 <400> 20  
 ctattgtaga aattgttttt cacagttgct caaaaacgat ggcagtgact tatgagttac 60  
 gttacacttt ggagtctcat ctttagtaaa catatcataa tattcgatat tacgagttga 120  
 20 catatcgaac aaattccaag tatttgattt tggataatat tcgtattttg catctgctat 180  
 aattaagata taatcacgcg aagaacacac gaacatcttt cctacatggt taaagtacat 240  
 gtacaattct atccatttgt ctctcttaac tatatatattg tatagataat tacgagttctc 300  
 gtgagtaatt ccagtaatta catagatgtc gccgtcgtac tctacagcat aaactatact 360  
 atgatgtcta ggcattggag acttttttat ccaacgattt ttagtgaaac attccacatc 420  
 25 gtttaatact acatattttt catacgtggt ataaactcca cccattacat atatatcatc 480  
 gtttacgaat accgacgcgc ctgaatatct aggagtaatt aagtttgga gtcttatcca 540  
 tttcgaagtg ccgtgtttca aatattctgc cacacccgtt gaaatagaaa attctaatec 600  
 tcctattaca tataactttc catcgttaac acaagtacta acttctgatt ttaacgacga 660  
 catattagta accgttttcc attttttcgt ttcaagatct accgcgata cggaataaac 720  
 30 atgtctattg ttaatcatgc cgccaataat gtatagacaa ttatgtaaaa catttgcat 780  
 atagaattgt ctatctgtat taccgactat cgtccaatat tctgtcctag gagagtaatt 840  
 ggttattgtg gatataataat cagagttttt aatgactact atattatgtt ttataccatt 900  
 tcgtgtcact ggctttgtag atttggtat agttaatccc aacaatgata tagcattgag 960  
 catagtatta gtcataaact tgggatgtaa aatgttgatg atatctacat cgtttggtt 1020  
 tttatgtatc cactttaata atatcatagc tgtaacatcc tcatgattta cgtaaacgtc 1080  
 35 ttcgtgggat aagatagttg tcagttcctc ctttgataat tttccaaatt ctggatcgga 1140  
 tgtcacgcga gtaaatattg tgattatttc tgacatcgac gcattatata gttttttaat 1200  
 tccatatctt ttagaaaagt taaacatcct tatacaattt gtggaattaa tattatgaat 1260  
 catagttttt acacatagat ctactacagg cggaacatca attattacgg cagcaactag 1320  
 tatcatttct acattgttta tgggtgatgt tatcttcttc cagcgcatat agtctaatag 1380  
 40 cgattcaaac gcgtgatagt ttataccatt caatataatc gtttcatcct ttagatgggt 1440  
 atcctgaatg cgtttaaaaa aattatacgg agacgccgta ataatttcct tattcacttg 1500  
 tataatttcc ccattgatag aaaatatcac gctttccat 1539

45 <210> 21  
 <211> 2358  
 <212> DNA  
 <213> Vaccinia virus

50 <400> 21  
 atggatgcgg ctattagagg taatgatgtt atctttgtcc ttaagactat aggtgtccca 60  
 tcagcatgta gacaaaatga agatccaaga ttctgtagaag catttaaatg cgacgagtt 120  
 aaaagatata ttgataataa tccagaatgt acactattcg aaagtcttag ggatgaggaa 180  
 55 gcatactcta tagtcagaat tttcatggat gtagatttag acgctgtct agacgaaata 240  
 gattatttaa cggctattca agattttatt atcgaggtgt caaactgtgt agctagattc 300  
 gcgtttacag aatgcggtgc cattcatgaa aatgtaataa aatccatgag atctaatttt 360  
 tcattgacta agtctacaaa tagagataaa acaagttttc atattatctt ttagacacg 420  
 tataaccacta tggatacatt gatagctatg aaacgaacac tattagaatt aagtagatca 480  
 tctgaaaatc cactaacaag atcgatagac actgccgtat ataggagaaa aacaactctt 540  
 60 cgggtttagt gtactaggaa aaatccaaat tgcgacacta ttcatgtaat gcaaccaccg 600  
 catgataata tagaagatta cctattcact tacgtggata tgaacaacaa tagttattac 660

5 ttttctctac aacgacgatt ggaggattta gttcctgata agttatggga accagggttt 720  
at tttcattcg aagacgctat aaaaagagtt tcaaaaatat tcattaattc tataataaac 780  
t ttaaatgac tcgatgaaaa taattttaca acggtaccac tggatcataga ttacgtaaca 840  
c cttgtgcat tatgtaaaaa acgatcgcat aaacatccgc atcaactatc gttggaaaat 900  
g ggtgctatta gaattttaca aactggtaat ccacatagtt gtaaagttaa aattgttccg 960  
t tggatggta ataaactgtt taatattgca caaagaattt tagacactaa ctctgtttta 1020  
t taaaccgaac gaggagacta tatagtttgg attaataatt catggaaaatt taacagcgaa 1080  
g aacccttga taacaaaact aattctgtca ataagacatc aactacctaa ggaatattca 1140  
a gcgaattac tctgtccgag gaaacgaaag actgtagaag ctaacatacg agacatgta 1200  
10 g tagattcag tagagaccga tacctatccg gataaacttc cgtttaaaaa tgggtgtattg 1260  
g accctggtag acggaatgtt ttactctgga gatgatgcta aaaaatatac gtgtactgta 1320  
t caaccggat ttaaatttga cgatacaaag ttcgtcgaag acagtccaga aatggaagag 1380  
t taatgaata tcattaacga tatccaacca ttaacggatg aaaataagaa aaatagagag 1440  
c tatatgaaa aaacattatc tagttgttta tgtggtgcta ccaaaggatg tttaacattc 1500  
15 t ttttttggag aaactgcaac tggaaagtgc acaaccaaac gtttgttaaa gtctgctatc 1560  
g gtgacctgt ttgttgagac ggggtcaaaca attttaacag atgtattgga taaaggacct 1620  
a atccattta tcgctaacat gcatttgaaa agatctgtat tctgtagcga actacctgat 1680  
t ttgacctgta gtggatcaaa gaaaattaga tctgataata ttaaaaagtt gacagaacct 1740  
t gtgtcattg gaagaccgtg tttctccaat aaaattaata atagaaacca tgctacaatc 1800  
20 a attatcgata ctaattacaa acctgtcttt gataggatag ataacgcatt aatgagaaga 1860  
a attgccgtcg tgcgattcag aacacacttt tctcaacctt ctggtagaga ggctgctgaa 1920  
a aataatgacg cgtacgataa agtcaaacta ttagacgagg ggtagatgg taaaatacaa 1980  
a aataatagat atagatttgc atttctatac ttgttggtga aatggtacaa aaaatatcat 2040  
g ttcctatta tgaaactata tcctacaccc gaagagattc ctgactttgc attctatctc 2100  
25 a aaaataggtta ctctgttagt atctagctct gtaaagcata ttccattaat gacggacctc 2160  
t tccaaaaagg gatatatatt gtacgataat gtggttactc ttccgttgac tactttccaa 2220  
c cagaaaatat ccaagtattt taattctaga ctatttggac acgatataga gagcttcac 2280  
a atagacata agaaatttgc caatgttagt gatgaatata tgcaatatat attcatagag 2340  
g atatttcat ctccgtaa 2358

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 612

&lt;212&gt; DNA

35 &lt;213&gt; Vaccinia virus

&lt;400&gt; 22

40 ttaataatcg tcagtattta aactgttaaa tgttggtata tcaacatcta ccttatttcc 60  
cgcagtataa ggtttgttgc aggtatactg ttcaggaatg gttacattta tacttcttct 120  
a tagtcctgt ctttcgatgt tcatcacata tgcaaagaac agaataaaca aaataatgta 180  
a gaaataata ttaaatatct gtgaattcgt aaatacattg attgccataa taattacagc 240  
a agtacaata cacacaatag acattcccac agtggttgcca ttacctccac gatacatttg 300  
a agttactaag caataggtaa taactaagct agtaagaggc aatagaaaag atgagataaa 360  
t tatcatcaat atagagatta gaggagggtc atatagagcc aagacgaaca aatcaaacc 420  
45 g agtaacgtt ctaacatcat tatttttgaa gattcccaaa taatcattca ttctccata 480  
a atcgttttgc atcatacctc catctttagg cataaacgat tgctgctgtt cctctgtaaa 540  
t aaatcttta tcaagcactc cagcaccgc agagaagtcg tcaagcatat tgtaatatct 600  
t aaataactc at 612

50

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
6. September 2002 (06.09.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 02/068682 A3

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12Q 1/68,  
C12N 15/10, 15/39, C07K 14/07

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/01909

(22) Internationales Anmeldedatum:  
22. Februar 2002 (22.02.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
101 08 626.1 22. Februar 2001 (22.02.2001) DE

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: SAHIN, Ugur [TR/DE]; III Medizinische

Klinik, Obere Zahlbacher Strasse 63, 55131 Mainz (DE). TUERECI, Özlem [DE/DE]; III Medizinische Klinik, Obere Zahlbacher Strasse 63, 55131 Mainz (DE). LUDEWIG, Burkhard [DE/DE]; III Medizinische Klinik, Obere Zahlbacher Strasse 63, 55131 Mainz (DE).

(74) Anwälte: VOSSIUS, Volker usw.; Holbeinstrasse 5, 81679 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,

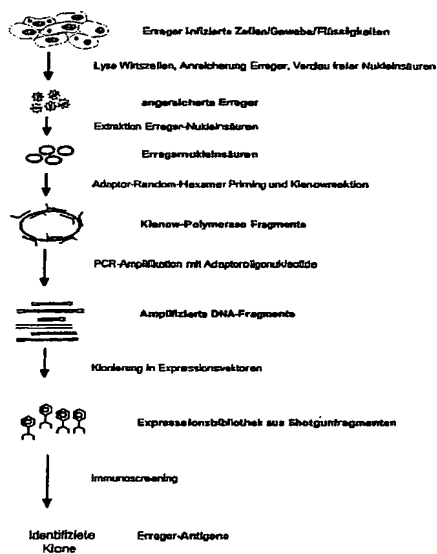
[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR IDENTIFYING BIOLOGICALLY ACTIVE STRUCTURES OF MICROBIAL PATHOGENS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR IDENTIFIZIERUNG BIOLOGISCH AKTIVER STRUKTUREN MIKROBIELLER ERREGER

(57) Abstract: The invention relates to a method for identifying biologically active structures which are coded by the genome by microbial pathogens, starting from genomic controlled nucleic acids.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Identifizierung biologisch aktiver Strukturen, die durch das Genom von mikrobiellen Erregern kodiert werden, ausgehend von genomischen Erregernukleinsäuren.



WO 02/068682 A3





SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,  
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

**Veröffentlicht:**

— mit internationalem Recherchenbericht

**(84) Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen  
Recherchenberichts:**

12. September 2003

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.*

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 02/01909

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12Q1/68 C12N15/10 C12N15/39 C07K14/07

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12Q C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ, MEDLINE, SEQUENCE SEARCH

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LANG SUSAN ET AL: "Identification of a novel antigen from Staphylococcus epidermidis." FEMS IMMUNOLOGY AND MEDICAL MICROBIOLOGY, vol. 29, no. 3, November 2000 (2000-11), pages 213-220, XP002225330 ISSN: 0928-8244	1,2,4,7, 8,20-24
Y	the whole document  --- -/--	3,5,6, 9-19,25

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 December 2002

Date of mailing of the international search report

02.05.03

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Seranski, P

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 02/01909

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PADMALAYAM INDIRA ET AL: "Molecular cloning, sequencing, expression, and characterization of an immunogenic 43-kilodalton lipoprotein of Bartonella bacilliformis that has homology to NlpD/LppB." INFECTION AND IMMUNITY, vol. 68, no. 9, September 2000 (2000-09), pages 4972-4979, XP002225331 ISSN: 0019-9567	1,2,4,7, 8,20-24
Y	the whole document	3,5,6, 9-19,25
Y	--- WO 90 09457 A (BIOGEN INC) 23 August 1990 (1990-08-23) page 5 -page 6	10-19,25
Y	--- US 5 731 171 A (BOHLANDER STEFAN K) 24 March 1998 (1998-03-24) column 2, line 55 -column 9, line 31 -----	10,11

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-25

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

The International Searching Authority has determined that this international application contains multiple (groups of) inventions, namely

Invention I: Claims 1-25

Method for the identification of biological structures coded by the genome of microbial pathogens.

Invention II: Claims 26-29 (in part)

Vaccinia virus antigen coded by the nucleic acid with the SEQ ID NO. 4.

Inventions III-XX: Claims 26-29 (in part in each case)

Vaccinia virus antigens coded by the nucleic acids with the SEQ ID NO. 5-22.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 02/01909

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9009457	A	23-08-1990	AU 5404890 A	05-09-1990
			CA 2046919 A1	15-08-1990
			EP 0458909 A1	04-12-1991
			WO 9009457 A2	23-08-1990
-----				
US 5731171	A	24-03-1998	NONE	
-----				

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12Q1/68 C12N15/10 C12N15/39 C07K14/07

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12Q C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank, und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ, MEDLINE, SEQUENCE SEARCH

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	LANG SUSAN ET AL: "Identification of a novel antigen from Staphylococcus epidermidis." FEMS IMMUNOLOGY AND MEDICAL MICROBIOLOGY, Bd. 29, Nr. 3, November 2000 (2000-11), Seiten 213-220, XP002225330 ISSN: 0928-8244	1,2,4,7, 8,20-24
Y	das ganze Dokument --- -/--	3,5,6, 9-19,25

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

17. Dezember 2002

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

02.05.03

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Seranski, P

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	PADMALAYAM INDIRA ET AL: "Molecular cloning, sequencing, expression, and characterization of an immunogenic 43-kilodalton lipoprotein of Bartonella bacilliformis that has homology to NlpD/LppB." INFECTION AND IMMUNITY, Bd. 68, Nr. 9, September 2000 (2000-09), Seiten 4972-4979, XP002225331 ISSN: 0019-9567	1,2,4,7, 8,20-24
Y	das ganze Dokument	3,5,6, 9-19,25
Y	--- WO 90 09457 A (BIOGEN INC) 23. August 1990 (1990-08-23) Seite 5 -Seite 6	10-19,25
Y	--- US 5 731 171 A (BOHLANDER STEFAN K) 24. März 1998 (1998-03-24) Spalte 2, Zeile 55 -Spalte 9, Zeile 31 -----	10,11



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP 02/01909

## Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2. ☐ Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.  
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

## Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☒ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:  
1-25

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

## WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

Erfindung I: Ansprüche 1-25

Verfahren zur Identifizierung von durch das Genom  
mikrobieller Erreger kodierter biologischer Strukturen

Erfindung II: Ansprüche 26-29 (teilweise)

Vacciniavirusantigen kodiert durch die Nukleinsäure mit der  
Seq ID Nr 4

Erfindung III-XX: Ansprüche 26-29 (jeweils teilweise)

Vacciniavirusantigene kodiert durch die Nukleinsäuren mit  
der Seq ID Nr 5-22

# INTERNATIONAL RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/01909

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9009457	A	23-08-1990	AU 5404890 A 05-09-1990
			CA 2046919 A1 15-08-1990
			EP 0458909 A1 04-12-1991
			WO 9009457 A2 23-08-1990
-----			
US 5731171	A	24-03-1998	KEINE
-----			

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**